УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Душко Корњача

Ефекти хиперхомоцистеинемије на параметре оксидационог стреса и активност ензима ацетилхолинестеразе у плазми и срцу пацова: улога гасних трансмитера (NO, H_2S и CO)

Докторска дисертација

Ментор: др сци. мед. Владимир Живковић, доцент

Крагујевац, 2018. године

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I Аутор
Име и презиме: Душко Корњача
Датум и место рођења: 13.08.1983. године, Чајниче, Република Српска, БиХ
Садашње запослење: ФИП –комерц д.о.о Београд, Пословница Нови Сад
II Докторска дисертација
Наслов: Ефекти хиперхомоцистеинемије на параметре оксидационог стреса и активност ензима ацетилхолинестеразе у плазми и срцу пацова: улога гасних трансмитера (NO, H_2S и CO)
Број страница: 153
Број слика: 8 табела, 24 графикона
Број библиографских података: 227
Установа и место где је рад израђен: Институт за медицинску физиологију "Рихард Буриан", Медицински факултет Београд
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: доц. др Владимир Живковић
III Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 17.07.2014. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-45/16; 04.02.2015. г.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија, председник; 2. Доц. др Владимир Живковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научну област Физиологија, члан; 3. Проф. др Драган Ђурић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, ужа научну област Физиологија, члан;
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: 1. Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија, председник; 2. Проф. др Драган Ђурић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, ужа научну област Физиологија, члан; 3. Доц. др Иван Срејовић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија, члан;
Датум одбране дисертације:

САЖЕТАК

Увод: С обзиром на доказано повећање активности ацетилхолинестеразе (AchE) унутар централног нервног система у условима хиперхомоцистеинемије, поставља се претпоставка да ли хомоцистеин може и у срчаном мишићу да регулише активност овог ензима. Повезаност метаболизма хомоцистеина, слободних радикала и гасотрансмитера у оквиру кардиоваскуларног система је још веома слабо истражена. Такође, врло је интересантно да у доступној литератури нема података о активности и евентуалној улози AchE у функцији срца, поготово у условима хиперхомоцистеинемије.

Циљ: Циљ овог истраживања је било испитивање ефеката акутне (индуковане ДЛ-хомоцистеином и ДЛ-хомоцистеин тиолактоном) и субхроничне хиперхомоцистеинемије (индуковане ДЛ-хомоцистеином) на концентрацију прооксидативних и активност антиоксидативних маркера у плазми пацова, као и на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву миокарда пацова.

Материјал и методе: Истраживање је дизајнирано као експериментална студија спроведена *in vitro* и *ex vivo*. У циљу изазивања акутне хиперхомоцистеинемије експерименталним групама је интраперитонеално администрирана једна доза ДЛ-хомоцистеина (8 mmol/kg тм) и ДЛ-хомоцистеин тиолактона (8 mmol/kg тм). Шездесет минута након апликације, животиње су се жртвовале ради прикупљања узорака крви (за мерење маркера оксидационог стреса) и узимања ткива срца у чијем хомогенату се одређивала активност AchE. Субхронична хиперхомоцистеинемија је изазвана апликацијом ДЛ-хомоцистеина (0.45 μmol/g тм. s.c., два пута дневно у интервалу од 8 сати, у периоду од четрнаест дана).

Резултати: Акутна и хронична хиперхомоцистеинемија су повезане са снижењем активности ацетилхолинестеразе у срцу пацова. Ови налази сугеришу да хомоцистеин путем дејства на AchE може да мења холинергичку контролу срчане функције односно да инхибицијом разградње ацетилхолина потенцира снажнији и дуготрајнији негативни холинергички ефекат на срце. Блокада продукције NO и CO је била повезана са снижењем активности ацетилхолинестеразе. Ова сазнања индикују да NO и CO сигнални путеви могу да имају улогу у модулацији активности овог ензима. На основу наших налаза уочава се да је овај ефекат био најизраженији у случају NO сигнализације. Редукција срчане AchE активности под утицајем хомоцистеина прелази у значајан пораст приликом апликације инхибитора синтезе гасотрансмитера. На овај начин потенцирање холинергичких дејстава хомоцистеина у срцу не само да престаје у условима одсуства деловања гасотрансмитера, већ постаје смањено захваљујући појачаној разградњи ацетилхолина.

Закључак: Добијени резултати дају оригиналан и битан допринос у разумевању улоге ацетилхолинестеразе у функцији миокарда у условима хиперхомоцистеинемије, као и у условима смањења доступности појединих гасотрансмитера, чиме се отвара низ могућности за испитивање шире клиничке примене, имајући у виду значај хомоцистеина у настанку патолошких ентитета кардиоваскуларног система.

Кључне речи: ацетилхолинестераза, гасотрансмитери, срце, пацов, хомоцистеин

ABSTRACT

Introduction: Considering the proven increase in activity of acetylcholinesterase (AchE) within the central nervous system under conditions of hyperchomocysteinemia, it is assumed that homocysteine can also regulate the activity of this enzyme in the heart muscle. The association of metabolism of homocysteine, free radicals and gasotransmitters within the cardiovascular system is still very poorly investigated. It is also very interesting that in the available literature there is no information regarding the activity and the possible role of AchE in the function of the heart, especially in the conditions of hyperhomocysteinaemia.

Aim: The aim of this study was to investigate the effects of acute (induced by DL-homocysteine and DL-homocysteine thiolactone) and subchronic hyperhomocysteinemia (induced by DL-homocysteine) on the concentration of prooxidative and activity of antioxidative markers in rat plasma as well as the activity of acetylcholinesterase enzymes in myocardial tissue rats.

Material and methods: The research was designed as an experimental study conducted *in vitro* and *ex vivo*. In order to induce acute hyperchomocysteinemia to experimental groups, one dose of DL-homocysteine (8 mmol / kg tm) and DL-homocysteine thiolactone (8 mmol / kg tm) was administered intraperitoneally. Sixty minutes after application, animals were sacrificed to collect blood samples (for measuring oxidative stress markers) and heart tissue was taken in whose homogenate the AchE activity was determined. Subchronic hyperchomocysteinemia was caused by the application of DL-homocysteine (0.45 μmol / g of tm.s.c., twice daily for an interval of 8 hours, for a period of fourteen days).

Results: Acute and chronic hyperchomocysteinemia were associated with a decrease in acetylcholinesterase activity in the heart of rats. These findings suggest that homocysteine can alter the cholinergic control of the cardiac function via the action on AchE, that is, by inhibiting the decomposition of acetylcholine, a stronger and longer-lasting negative cholinergic effect on the heart. Blockage of NO and CO production was associated with a decrease in acetylcholinesterase activity. These findings indicate that NO and CO signal pathways can play a role in modulation of the activity of this enzyme. Based on our findings, it can be noted that this effect was most pronounced in the case of NO signaling. Reduction of cardiac AchE activity under the influence of homocysteine transitions to a significant increase after application of gasotransmitter synthesis inhibitors. On this way, the potentiation of cholinergic effects of homocysteine in the heart not only stops under the conditions of absence of the action of the gasotransmitter, but becomes reduced due to the intensified degradation of acetylcholine.

Conclusions: The obtained results give a novel and important contribution to understanding the role of acetylcholinesterase in the function of myocardium in the conditions of hyperhomocysteinemia, as well as in the conditions of reducing the availability of specific gasotransmitters, thus opening up a range of possibilities for testing wider clinical application, bearing in mind the significance of homocysteine in the onset of pathological entities of the cardiovascular system.

Key words: acetylcholinesterase, gasotransmitters, heart, rat, homocysteine.

САДРЖАЈ

I УВОД

1.1. ХЕМИЈСКЕ ОДЛИКЕ ХОМОЦИСТЕИНА

У процесу разградње метионина долази до стварања његовог главног метаболита хомоцистеина, који уједно представља и његову основну компоненту. Хемијска структура хомоцистеина је откривена средином тридесетих година прошлог века. По свом хемијском саставу хомоцистеин је у основи аминокиселина. Грађа хомоцистеина је најсличнија глутатиону и цистеину и са њима заједно представља најпрепознатљивије амино тиолно једињење, које је присутно код сисара. У организму сисара хомоцистеин се налази у два облика: 1. слободни и у облику 2. дисулфида, везаних за протеине.

Од целокупне вредности хомоцистеина у организму сисара, на слободни хомоцистеин отпада просечно између 1-2%. Остала, већа количина хомоцистеина, (око 80%) се налази везан за протеине и то претежно албумине. Ако површно анализирамо хемијску структуру амино тиолних једињења, стиче се утисак да су они готово идентични. Међутим, њихова функционална улога у организму је доста различита. Главни елемент који креира различитост ових једињења је појам „тиол” и односи се на присуство S-H групе која одређује основу препознатљивости функције ових једињења.

Основна функционална карактеристика тиолне групе је да омогући укључивање хомоцистеина у веома важне метаболичке процесе. По свом молекуларном саставу цистеин и хомоцистеин представљају мале молекуле, са малом молекуларном масом, која за цистеин износи 121,2 а за хомоцистеин 135,1. Из хемијске структуре се закључује да код хомоцистеина постоји једна метиленска група више. За разлику од њих глутатион представља трипептид (γ- глутамил –цистеинилглицин), чија молекулска маса износи 307,3, а цистеин у овом једињењу представља носиоца „тио“ групе (1).

Са физичко-хемијског аспекта, осим утицаја на pK вредност, S-H група одређује и оксидо-редукциони потенцијал. Поред ове две врло важне улоге, S-H група учествује и у формирању слободних радикала. Слободни радикали су супстанце које значајно утичу и на параметре који са биолошко-хемијског гледишта поседују способност медијације у многим, врло комплексним метаболичким активностима. Са једне стране имају важну улогу заштите ћелија и ткива сисара, док истовремено могу да представљају иницијаторе за настанак отровних једињења, која изазивају многе и различите штетне последице по те исте организме. Важно је напоменути да постоје

велике сличности између тиолне (R-SH) и алкохолне (R-OH) групе. Ове сличности су логичне ако се зна да и сумпор и кисеоник припадају истој групи периодног система. Њихове међусобне разлике су настале као последица специфичних физичко-хемијских константи, тиолне и алкохолне групе. Овако специфичан међусобни однос, тиолне (S-H) и алкохолне (O-H) групе је настао као последица саме дужине њихових веза. Алкохолна O-H веза је краћа у односу на S-H везу. Због овакве разлике у дужини веза, лако је разумети зашто је јачина кисеоник–водоник O-H везе већа у алкохолној у односу на ону која је присутна код S-H групе. Енергија дисоцијације тиолне групе у односу на алкохолну је нижа, и поред тога што је електронегативност сумпора мања него код кисеоника. Након овог сазнања не треба да нас чуди изражена појава RS^- анјона у многим биохемијским процесима (2).

Ако се повећа pH вредност средине, онда се истовремено повећава и дисоцијација тиолне групе. Пошто смо напоменули да је тиолна S-H веза значајно слабија у односу на O-H везу, онда је она уједно подложнија и бржој оксидацији. Ова наведена специфичност ствара велику разлику између ове две велике групе органских једињења, када је у питању изложеност дејству различитих оксидационих агенаса. Значај оксидационог процеса код свих алкохола се огледа у промени степена оксидације O-H групе најближег угљениковог атома. За разлику од оваквог процеса који смо видели код алкохола, процес оксидације код тиола, изазива различите степене оксидације сумпора S-H групе. У нормалним физиолошким процесима, тиоли се углавно оксидишу до сулфида (RSSR). Ако процес оксидације посматрамо искључиво са хемијског аспекта, могућност оксидације до сулфеничне (RSOH), сулфидне ($R-SO_2H$) и сулфоничне (RSO_3H) киселине је доста занемарљив. Ово се догађа због тога што је оксидација овог типа карактеристична за присуство јачих оксидационих агенаса, који се не могу одвијати у физиолошким условима (3).

Када се говори о вредности оксидационог потенцијала биолошки значајних тиола и дисулфида, он је приближно идентичан и његова вредност се креће у распону од -0,2 до -0,4 V. У биохемијској реакцији по типу $2RS \rightarrow 2RSSR + 2e$ фаворизована је надградња дисулфида. Алифатични тиоли учествују у процесу спровођења многих редокс реакција, тако што међусобно реагују са великим бројем различитих биолошки активних супстанци, као што су то нпр. (цитохроми, редуковани кисеонички радикали, флавоноиди, аскорбати итд). Код набројаних реакција тиоли се преводе у одговарајуће дисулфиде, док у присуству јона метала као катализатора постоји могућност оксидације

тиола. Као последица ове реакције долази до надградње нестабилног тиол радикала (RS) који се формира из одговарајућег RS^{-} међупреносника, и он налази се као слободан или је везан за метални катализатор (3).

Поменута биохемијска реакција тиола са халидима, захтева да буде пажљивије размотрена, због могућности његовог утицаја на биохемијске процесе, који се одвијају у пределу васкуларног система. Велика је вероватноћа да у реакцијама биолошки активних тиола са алкил и арил халидима, они учествују као супстанце које могу да замене поједине групе, тако да се као крајњи производи добијају одговарајући сулфиди (RSR^{-}). Можемо претпоставити да постоји још једна значајна могућност да се у овим процесима одвија и нуклеофилна адиција RS анјона на алфа и бета незасићене карбонилне групе (C=C=O), које се налазе у бета позицији. Као примере ових реакција можемо навести деловање са витамином К и норепинефрином. Када дође до међусобне хемисјке реакције тиола са двогубом везом цијаната (C=N), тада се као производ овог процеса стварају тиокарбонати (NH_2-CO-SR). Сам процес одвијања ових реакција пружа могућност да се покрену адициони процеси на цикличној структури NAD, који ће касније створити предуслове који би довели до испољавања његове кофакторске улоге (3, 4).

Поред горе наведених разлика у хемијском понашању тиола у односу на алкохоле, као пример њихове различитости можемо навести и однос тиола са карбонилном групом. Тиоли чија је тиолна група блиска амино групи, добро реагују са карболнилним материјама и дају релативно стабилан тиазолидин. Ако у биохемијским процесима дође до удаљавања SH- и NH_2 групе, тада се аутоматски надгради хемимеркаптана. Упоредо са спровођењем горе поменутих реакција, одвијају се и други биохемијски важни процеси на карбоксилној групи одговарајућих киселина (RCO_2H), где као коначни продукт добијају тиоестри. Као репрезентативан пример оваквих реакција, можемо навести њихову реакцију са коензимом А. У овој реакцији долази до надградње потребног RS^{-} ацил продукта, који је одговоран за ацилацију у многим биохемијским реакцијама. У последње време је велика пажња усмерена на процес специфичног стварања хомоцистеин тиолактона, који настаје искључиво из хомоцистеина. Циклизација у овом процесу се убрзава ако се снизи вредност pH. У већем броју нових истраживања сугерише се да је овај процес врло значајан за функционисање организма у физиолошким условима (3, 4).

Хомоцистеин

CO_2H
|
NH_4 C- H
|
CH_2
|
SH

Цистеин

CO_2H
|
NH_4 - C - H
|
CH_2
|
CH_2
|
SH

Глутатион

CO_2H
|
CH_2
|
NH
|
CO
|
C- CH_2-SH
|
NH
|
CO
|
CH_2
|
CH_2
|
H_2N-CH
|
CO_2H

Слика бр. 1. Биогени амино-тиоли

Слободан хомоцистеин

NH_3 + $CHCH_2CH_2SH$
|
COO–

Цистин

NH_3 + $CHCH_2SH$
|
COO–

Хомоцистин

NH_3 + $CHCH_2CH_2S$-S $CH_2CH_2CHNH_3$
| |
COO– COO–

Протеински везани хомоцистин

протеин– S-SCH_2CHNH_3
| |
HS COO–

Слика бр. 2. Облици хомоцистеина у организму

Ако хомоцистеин и њему слични биогени тиоли ступе у реакцију са азотним оксидима: азот-диоксидом (NO_2), диазот-триоксидом (N_2O_3) и диазот-тетраоксидом (N_2O_4), онда ће они тежити да остваре међусобну реакцију са металним нитрозил комплексима (M-NO). Као коначни производи у оба ова случаја настају C-нитрозотиол или тионитритни (RS-NO) производи. Овако настале супстанце имају својство да снажно активирају ензим гванилат-циклазу која представља врло важан интермедијер у метаболизму ендотелијумског релаксирајућег фактора.

Само разлагање тиолактона такође доприноси да се спроведе велики број метаболичких процеса и активности важних метало тиол зависних ензима. Као производ ових процеса настаје успостављање NO-метал и S-метал веза, које представљају посебан облик кисело отпорних хелатних комплекса са металним јонима (4).

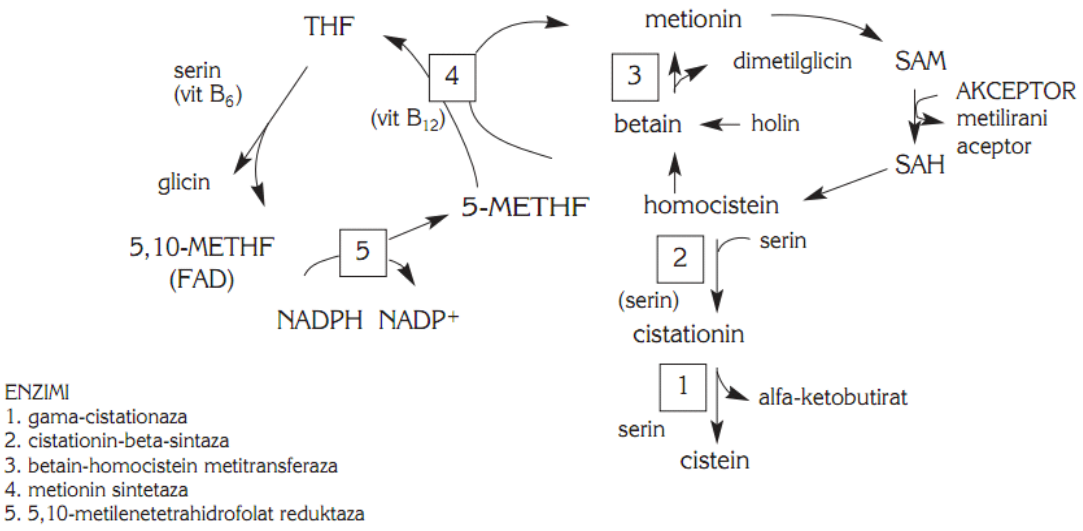
1.2. МЕТАБОЛИЗАМ ХОМОЦИСТЕИНА

Ако бисмо желели да дефинишемо хомоцистеин чисто са хемијског становишта, онда га без неких већих оспоравања можемо сврстати у аминокиселину. Уколико хоћемо да хомоцистеин посматрамо чисто са биохемијског гледишта и ако уважимо правило да се појам аминокиселине представља као субјединица у синтези протеина, онда се за њега не може рећи да је права аминокиселина, јер он не учествује у наведеном процесу. Имајући ово у виду, хомоцистеин би се најпре могао назвати метаболитом есенцијалне аминокиселине метионина.

Сам процес из којег настаје хомоцистеин представља врло сложен биохемијски пут, који је беспрекорно регулисан. Овај процес добија на свом значају тек после сагледавања чињенице да он учествује у реметилационом циклусу, који доводи до поновне синтезе и обнављања метионина. Процес метаболизма метионина започиње његовим укључивањем у синтезу протеина, дакле самом синтезом S-аденозилметионина. S-аденозилметионин процесом декарбоксилације, учествује у синтези спермидина или представља даваоца метил групе уз издвајање аденизилхомоцистеин односно хомоцистеина. У даљем процесу метаболизма хомоцистеина овај метаболички пут бива затворен, тако што наступа фаза ресинтезе метионина, али један део бива неповратно метаболисан до цистеина (5).

У организму сисара свака ћелија је оспособљена да може обавити процес метаболисања метионина. Да би се расположива количина метионина метаболисала, процес мора да се одвија кроз две важне реакције, које се налазе у врло снажној међусобној повезаности. Прва реакција је протеинска синтеза или почетна реакција метионин-хомоцистеин-метионин циклуса. Друга реакција је надградња S-аденозилметионина. Да би се реакција трансформације метионина до S-аденозилметионина одиграла неопходно је да буде катализована ензимом метионин–аденозил–трансферазом (EC 2.5.1.6). Овај ензим је присутан у три изоензимске форме. Једна метионин-аденозил-трансфераза је присутна у јетри и има релативно високу вредност Км и она је позитивно модулисана аденозилметионином. Захваљујући овој ензимској форми, јетра је у могућности да успешно учаествује у контроли повишених вредности метионина у исхрани и циркулацији. Способност јетре да учествује у разградњи повишених вредности метионина у исхрани и циркулацији, омогућена је само ако у њој постоји ова ензимска форма (метионин-аденозил-трансфераза).

Приликом метаболизма метионина у јетри у њој долази до великих (скоковитих) промена концентрације аденозилметионина. Овакав буран процес разградње се не догађа у другим ткивима и органима, јер је вредност ензима метионин–аденозил-трансферазе у њима релативно уједначена. Аденозилметионин у највећем делу остаје депонован у ћелијама где је и настао (6).



Слика бр. 3

Метил група из аденозилметионина се може предати у некој од трансметилационих реакција или се може под дејством ензима аденозилметионин декарбоксилазе даље подвргава процесу декарбоксилације (EC 4.1.1.5). У овом процесу декарбоксилације, метил група даје пропиламинско језгро, које је неопходно за синтезу полиамина, као што је на пример путресцин. Декарбоксилацијом настали 5–метилтиоаденозин се укључује даље у кружни процес, из којег као коначни резултат настаје ресинтеза метионина. У великом броју радова је доказано да се на овај пут декарбоксилације утроши свега око 10% аденозилметионина, док се остали део употребљава за даљу синтезу хомоцистеина (7).

Остатак од 90% аденозилметионина представља важан извор метил групе. Он се даље укључује у различите биохемијске процесе и предаје многим донорима у присуству различитих трансфераза уз издвајање S-аденозилхомоцистеина. Један од најважнијих ензима из ове групе трансфераза је глицин-метил-трансфераза.

Највећи капацитет од свих ензима који учествује у катализацији трансметилације без обзира на хемијски састав метил донора је S-аденозилхомоцистеин и он уједно представља и најснажнијег инхибитора овог процеса. Да би се обавила нормална кинетика у трансметилационом циклусу неопходно је да овај процес буде правилно контролисан (благовременим уклањањем S-аденозилхомоцистеина). Да би дошло до уклањања овог метаболита неопходно је да се створе предуслови за правилно функционисање три биохемијска пута (8).

Први од ова три пута је ензимски катализован помоћу ензима аденозинхомоцистеиназе (EC 3.3.1.1) и он омогућава да дође до започињања метионин-хомоцистеин-метионин циклуса, из кога ће касније да настане хомоцистеин.

Други пут којим се уклања S-аденозихомоцистеин је процес у којем се он везује за протеине унутар самих ћелија. Ако је капацитет интраћелијског везивања преоптерећен (успорен) онда се вишак S-аденозилхомоцистеина транспортује изван ћелија. Овако створени метаболити се могу депоновати и у паренхиму бубрега (9). Овај процес је катализован са два карактеристична ензима и то бетаин-хомоцистеин-метилтрансфераза и метилфолат-хомоцистеин метилтрансфераза.

У трећем путу долази до трајног уклањања хомоцистеина из организма. Било који од наведених метаболичких путева може да буде обављен у самој ћелији у којој долази до надградње хомоцистеина или може даље да се транспортује у други орган као што је јетра у којој се катаболички процеси много брже одвијају. Да би се наставио

процес ресинтезе хомоцистеина, неопходно је да у организму и ткивима буде присутан ензим бетаин-хомоцистеин-метилтрансфераза (EC 2.1.1.5) (10).

Други ензим који учествује у катализацији трансметилационог процеса у готово свим ткивима сисара је метилфолат-хомоцистеин метилтрансфераза. Као главни метил донор у овој реаксцији се појављује 5-метилтетрахидрофолат. Незаменљиви кофактор за функионисање ензима метил-хомоцистеин метилтрансферазе је цијанкобаламин. Поменуте метилазе у процесу ресинтезе хомоцистеина имају и трећег такмаца цистатион-β-синтетазу. Овај ензим започиње уклањање хомоцистеина из метионин–хомоцистеин-метионин циклуса у транссулфурационом метаболичком путу и као његов крајњи продукт настаје цистеин. У овом процесу учествује и ензим с-цистатионаза. Оба ензима (цистатион-β-синтаза и с-цистатионаза) су зависна од пиридоксал-фосфата (11).

1.2.1. Заступљеност ензима укључених у метаболизам хомоцистеина по органима и ткивима

Ензими који су укључени у метаболизам хомоцистеина нису равномерно заступљени у свим органима и ткивима. Највише ових ензима се налази у јетри. У њој је најзаступљенији изоензимски облик метионин-аденозил трансферазе са највећом вредности Км. Поред тога у јетри свих сисара најраспрострањенији ензим је бетаин-хомоцистеин метилтрансфераза. Од свеукупног броја ензима који су присутни у организму, једини који се налази у свим органима и ткивима сисара је метилфолат-хомоцистеин-метилтрансфераза.

Одређених ензима као што је цистатионин-β-синтаза нема у срцу, плућима, тестисима, надбубрежној жлезди и слезини. Ензим с-цистатионаза се не налази у мозгу и адипоцитима. У организму сисара транссулфурациони пут метаболизма хомоцистеина се у потпуности може обавити у само четири органа: јетри, бубрезима, малом интестинуму и панкреасу. Уједно су ово органи који имају и највећу потребу за ресинтезом глутатиона (12).

1.2.2. Механизми који регулишу метаболизам хомоцистеина

Да би се правилно регулисао метаболизам хомоцистеина, неопходно је да у организму дође до обезбеђивања равнотеже у брзини одвијања два метаболилка пута,

чија се додирна тачка налази баш на нивоу стварања хомоцистеина. Та два пута чине, циклус ресинтезе метионина с једне и транссулфурациони пут, с друге стране. Основна улога ензима цистатион-β-синтетазе је да омогући започињање транссулфурације и да узме учешћа у процесу уклањања хомоцистеина из организма. Главна улога ензима глицин-трансферазе је да учествује у елиминацији метил групе метионина. Да би се постигла равнотежа са овим наведеним процесима ,неопходно је да се обави метилација хомоцистеина. Процес метилације се обавља са квантитативно најзначајнијом метилфолатхомоцистеин-метилтрансферазом, и мањим делом под дејством бетаин-хомоцистеин метилтрансферазе (13).

Начин расподеле хомоцистеина између ова два наведена пута модулисан је помоћу два механизма. Први механизам расподеле се заснива на потенцирању различитости у афинитетима ових ензима (метилаза) за супстрат. Км вредности за обе метилазе износе 0,6 mmol/L хомоцистеина. Са друге стране, вредности Км за ензим цистатион-синтазу су сто пута веће у односу на обе метилазе. Из ових наведених података се може закључити да је конзервација метионина кроз реметилациону секвенцу значајно фаворизованији метаболички пут. Такође, на основу овог сазнања, можемо да приметимо да ензим цистатион-синтаза може да започне коришћење хомоцистеина тек у условима када је капацитет за метилацију хомоцистеина већ засићен (преостали део).

Други регулациони механизам се у основи заснива на карактеристикама три метаболита: аденозилметионина (AdoMet), аденозилхомоцистеина (AdoHcy) и 5-метилтетрахидрофолата (MTHF). Улога AdoMet-а је да инхибира синтезу MTHF-а и инактивира активност бетаин-метилтрансферазу. Повећање концентрације AdoMet, које настаје као логична последица значајнијег уноса метионина храном фаворизује појачану активност трансулфурационог пута, што за коначни резултат има директну инхибицију метилације хомоцистеина, због спречавања синтезе довољне количине MTHF. Будући да је концентрација AdoMet најизраженија у јетри, онда је и расподела између конкурентских метаболичких путева у њој релативно већа у односу на остале органе (14).

Независна истраживања спроведена са намером да се испита утицај AdoMet на регулацију метаболизма хомоцистеина су потврдила и допунила наша сазнања о инхибицији глицин метил-трансферазе MTHF-ом. Резултати ових истраживања су открила још један, допунски механизам регулације метаболизма хомоцистеина. Наиме,

инхибиција синтезе MTHF-а помоћу AdoMet-а узрокује редукцију инхибиције глицин трансферазе и самим тим омогућава да се транссулфурациони пут наметне као примарни и доминантни. У случају смањења вредности AdoMet-а очекује се супротан ефекат (15).

Утицај аденозил хомоцистеина (AdoHcy) на регулацију метаболизма хомоцистеина је у потпуној супротности са учинком AdoMet-а. С обзиром да је његово дејство занемарљиво у јетри, он има важан утицај у нехепатичним ткивима, где му концентрација флуктуира много више од AdoMet-а (16).

1.2.3. Грешке у регулацији метаболизма хомоцистеина-хиперхомоцистеинемија

Досадашња сазнања су показала да повећан унос метионина храном може да иницира одступање од физиолошке регулације метаболизма хомоцистеина односно повећање његових вредности (хиперхомоцистеинемија). У најчешће факторе који могу да утичу на настанак хиперхомоцистеинемије спадају: генетски, недовољна количина ко-фактора за ензимски катализоване реакције у метаболичком путу хомоцистеина. Након великог броја обављених научних истраживања, откривене су грешке настале у метаболизму хомоцистеина, које су очигледно биле изазване генетским променама, што се значајно одразиле на правилну синтезу ензима цистатион-синтетазу и метилентетрахидрофолат редуктазу (MTHFR). Такође су откривене грешке у синтези бетаин-хомоцистеин метилтрансферазе (BHMT) и метионин-синтазе, али због тога што се ретко догађају слабије су и изучаване (17).

Повећане вредности хомоцистеина у организму-хиперхомоцистеинемија, у основи значи повећање како слободног тако и везаног хомоцистеина, дакле ради се о повећању концентрација укупног хомоцистеина. Такође долази до повећања концентрације интрацелуларног Аденозилхомоцистеина (AdoHcy), што за последицу има инхибицију AdoMet зависних трансметилационих реакција. Ове промене би могле да представљају главни узрок накнадних биолошких и хемијских ненормалности. Да би се боље и лакше разумела проблематика настанка и последица хиперхомоцистеинемије, неопходно је да се изврши систематизција фактора, који могу, познатим и непознатим механизмима да доведу до ове појаве. Факторе који могу да изазову настанак хиперхомоцистеинемије делимо на: генетске, физиолошке, патолошке и фармаколошки активне супстанце.

1.2.3.1. Утицај генетских фактора на настанак хиперхомоцистеинемије

Као што смо навели раније, утицај генетских фактора на појаву настанка хиперхомоцистеинемије је до сада доста проучен. Својом активношћу ензим метилентетрахидрофолат-редуктаза (MTHFR) омогућава конверзију 5, 10 метилентетрахидрофолата у 5-метилентетрахидрофолат, у присуству NADPH. Једињење 5-метилентетрахидрофолат је супстрат за цијанкобаламин зависну метионин синтазу. Метилентетрахидрофолат редуктаза (MTHFR) је флавин зависни ензим, који се састоји од две једнаке 77 кДа субјединице, са N-терминалним каталитичким доменом и с-терминалним регулаторним доменом.

До сада је описано око 50 случајева тешке MTHFR дефицијенције, који су били праћени тешким неуролошким и васкуларним компликацијама. Овај ген, одговоран за синтезу ензима је клониран, и описано је до сада 14 каракеристичних мутација. У најчешће мутације које доводе до појаве води ка термолабилности ензима, су познате као C677T. Ова мутација је изазвана аланин-валин супституцијом. Оно што карактерише ову мутацију је то да се она јавља доста често али да се разликује по учесталости јављања зависно од етичке припадности. У Канади, код припадника француске популације, она се креће негде око 38%, док код припадника афричког дела америчке популације, износи једва око 10%. У другим научним студијама проценат присуства ових мутација се креће између 25-39%. Питање заступљености појаве ове мутације која доводи до појаве хиперхомоцистеинемије (квантитативна заступљеност) код хомозигота у односу на хетерозиготе није до краја одговорено (18).

Витамин Б12 зависна метионин-синтаза (MS) присутна је у свим ћелијама и ткивима организма сисара. У односу на неке друге генетске малформације учесталост јављања грешака у синтези овог ензима дефинитивно је много мања у односу на MTHFR, али је данас она предмет научних проучавања. Хемијска структура MS сДНК је данас позната и она се састоји од 3798 нуклеотида, који детерминишу секвенцу од 1265 аминокиселина, укупне молекулске масе 140 кДа. Захваљујући истраживању фибробласта пацијената са MS дефицијенцијом, одређена су два типа MS дефицијентне болести. Један тип болести је познат као цблE, док је други познат као cblG тип. Поремећаји код cblE алтернације се односи на редукцију самог MS ензима, док се промене код cblG типа односе на промену MS апоензима (19).

Да би дошло до укључивања у транссулфурациони пут, хомоцистеин мора бити

катализован витамин Б6 зависном цистатион-β-синтазом (CBS). Овај ензим има ограничену ткивну дистрибуцију. До сада су истраживачи успели да опишу неколико стотина случајева CBS дефицијенције. Овај облик поремећаја је уједно и најчешћи узрок јављања хомоцистеинурије. Хумани облик сДНК за CBS располаже са 2554 нуклеотида, који кодирају секвенцу субјединице од 551 аминокиселина молекулске масе око 63 кДа. На овом CBS гену је откривено око 40 мутација. Претпоставља се да је 0,5-1,5% сваке популације захваћено хетерозиготном формом CBS-дефицијенције. Због немогућности а једним делом и незаинтересованости научних кругова до сада је у највећем броју случајева овој део популације остајао неоткривен. Ензимски дефицит овог типа се због ових разлога до сада водио као асимптоматски. Код ових болесника вредности хомоцистеинемије су благо повишене. Имајући у виду чињеницу да је овај облик генетског поремећаја до сада био третиран као асимптоматски, у научним круговима су у току опсежна испитивања везана за евентуалну повећану осетљивост ових особа на хомоцистеин индуковане ноксе. Код хомозиготних форми асимптоматских болесника, вредности хомоцистеинемије се често крећу и више од 50 mmol/L, код њих је такође повећана и концентрација метионина (20).

1.2.3.2. Утицај физиолошких фактора на вредност хомоцистеина

У групу физиолошких фактора који могу да утичу на вредност хомоцистеина убрајамо следеће: старост, пол, и начин живота. Услед процеса старења, може доћи до повећања средње концентрације укупног хомоцистеина. Код особа старијих од 50 година у зависности од припадности одређеној популационој групи, може доћи до повећања вредности хомоцистеинемије просечно и до 1,9 mmol/L, него код оне која је млађа од ове критичне старосне границе. За разлику од мушке популације, где се вредност хомоцистеинемије креће око 1,6 μmmol/L, код жена ова вредност може бити још израженија и износи 2,2 μmmol/L.

Са друге стране, концентрација укупног хомоцистеина код мушкараца је за око 25% виша него код пременопаузалних жена. Тек после менопаузе ова разлика се значајно смањује па некад и потпуно нестаје. Током трудноће, због смањења концентрације циркулишућих албумина за који се везује већи део хомоцистеина, долази до карактеристичног смањења хомоцистеинемије. Врста и начин исхране такође спадају у врло важан елемент који може да утиче на вредност хомоцистеина.

Код здравих особа, ниво серумског укупног хомоцистеина варира са уносом метионина храном. На основу великог броја истраживања можемо да запазимо да је храна животињског порекла много богатија метионином од других врста намирница. Као пример заступљености хомоцистеина у појединим намирницама навешћемо неке од њих.

- Месо и риба - 2,7 g/100 g,
- јаја - 3,2 g/100 g,
- кравље млеко - 2,9g/100 ml,
- хумано млеко - 1,4 g/100 ml метионина.
- Воће и поврће - 0,9-1,2 g/100 g, са изузетком бресака и грожђа - 3,6/100 g

На основу нових истраживања, која су обављена у *in vitro* условима није уочена међуреакција између липопротеина и хомоцистеина (21).

Општи услови и начин живота, уз излагање факторима ризика као што су пушење, алкохол, слаба физичка активност, изложеност стресу, су најчешће праћени са појавом хиперхомоцистеинемије.

1.2.3.3. Утицај патолошких стања на хиперхомоцистеинемију

Из великог броја научних студија може се закључити да се као најчешћи разлог појаве умерене хиперхомоцистеинемије наводи недостатак одређених група витамина. Сама улога витамина у овим стањима је неопходна да би се потпомогло испољавање катаболитичких активности ензима који су укључени у метионин-хомоцистеин-метионин циклус. Од најважнијих витамина који су укључени у овај процес можемо навести следеће; цијанкобаламин, пиридоксал фосфат, фолна киселина. После многобројних истраживања, заузет је општи закључак да су неадекватна исхрана или стање малапсорпције у којима недостају ове супстанце, саме по себи повећавају ризик од појаве хиперхомоцистеинемије. Повишене вредности хомоцистеина у организму се могу јавити и код здравих, правилно храњених особа услед постојања негативне корелације између нивоа ових витамина и хомоцистеина. Овај однос је још израженији посебно код старијих особа, када се ради о витамину Б12 (цијанкобаламин). Сличан односе се јавља и у случају фолне киселине, посебно код старијих особа, мада су истраживања код припадника ове популације доста оскуднија у односу на резултате код припадника млађих популација. Вредност хомоцистеина представља осетљивији

параметар за детекцију вредности витамина од хематолошких параметара као нпр. макро-овалоцитозе MCV (>100fL), хиперсегментације полиморфонуклеара, или директног одређивања серумског витамина Б12, плазматског или еритроцитног фолата (22).

Дијагностиковање смањених вредности цијанкобаламина се дифренцира у односу на смањену вредност фолата тако што се тражи налаз повишених вредности метилмалоничне киселине. Њена повишена вредност заједно са повишеном вредношћу укупног хомоцистеина, дају слику хиповитаминозе Б12.

Од три наведена витаминска кофактора (цијанкобаламин, пиридоксал фосфат, фолна киселина) утицај витамина Б6 на метаболички циклус хомоцистеина је најслабије истражен. Ако се пацијенти, који имају урођено смањење активности цистатион-β-синтазе, третирају редовно са пиридоксал-фосфатом (Б6) може доћи до смањења нивоа хомоцистеина у крви (али не и до физиолошких вредности). Малапсорпција витамин Б6 је много ређа од претходно наведених те је и вероватноћа за утицај исте на концентрацију хомоцистеина много мања. Вредности хомоцистеина у крви се налазе у директном односу са серумским креатинином и гломелуларном филтрацијом. Код повишених вредности уреје у крви, вредност редукованог хомоцистеина није повећана док је вредност протеински везаног хомоцистеина повишена. Ако бисмо спровели суплементациону терапију фолатима дошло би до побољшања резултата, али се вредности хомоцистеинемије никада не враћају на нормалу.

Резултати добијени после третмана витамина Б6 у основи су имали још слабији ефекат. Недовољно изражен одговор на третман фолном киселином може да се објасни присуством инхибитора фолатне коњугазе, који је недавно откривен код пацијената на хемодијализи. Да би дошло до активирања фолне киселине неопходно је да се изврши додавање глутамилног остатка неактивној форми витамина, што ће за резултат имати наградњу активног фолиполиглутамата. Дужина додатог радикала је контролисана равнотежним деловањем фолат-коњугазе, која тежи одвајању глутамилних остатака од полиглутамил-фолата, и фолил-полигамаглутамат-синтетазе која тежи додавању глутамилних остатака. Најснажнију биолошку активност имају фолилполиглутамати кратких ланаца, којих из горе поменутих разлога, код уремичних пацијената нема довољно. Примећено је и да хронична уремија, такође нарушава екстрареналну активност ензима одговорних за метаболизам хомоцистеина (23).

Поред јетре и бубрег представља значајно место у коме се обавља метаболизам хомоцистеина. Други механизам који се намеће као фактор који може да утиче на његов метаболизам су оштећене тубуларне ћелије, које више нису у могућности да ефикасно обављају транссулфурационе процесе у катаболизму хомоцистеина. После трансплантација бубрега и срца долази до повећања хомоцистеинемије, која се налази у позитивној корелацији са количинама примењених имуносупресива циклоспорином и кортикостероидима (24).

Поремећај нормалног метаболизма хомоцистеина може да буде присутан и код пацијената који болују од шећерне болести (Diabetes mellitus gradus I). Услед развоја болести може доћи до повишеног ризика за појаву микро и макроангиопатије, са ретинопатијом и нефропатијом, које су доста честа последица присуства ове болести. Присуство хиперхомоцистеинемије је евидентирано у пацијената код којих су дијагностиковани одмакли стадијуми ретинопатије. Код припадника ове групе, знаци хиперхомоцистеинемије су се јавили само код оних пацијената који су поред поменуте компликације имали присутне знаке нефропатије. За разлику од њих код пацијената који нису имали, или су били присутни минимални знаци ретинопатије, нису регистроване повишене вредности хомоцистеина (25). Болесници који болују од шећерне болести (Diabetes mellitus) имају често присутне и макроангиграфске компликације уз изражену хиперхомоцистеинемију што скупа доприноси појави нефропатије. Начин на који се одвија процес убрзане појаве атеросклерозе у горе наведеним случајевима није још разјашњен. Многи истраживачи га доводе у везу са поремећеним метаболизмом хомоцистеина на нивоу бубрега.

Велики број научних радова је обављено са циљем да се испита дејство различитих фармаколошки активних супстанци на ниво хомоцистеина у крви. Уочена је могућност да се из неколико фармаколошких група, путем различитих механизама, може извршити деловање на ниво хомоцистеинемије. У најважније супстанце које могу да утичу на њену вредност убрајамо: антифолате, азот моноксид, антагонисте витамина Б6, Л-допу, хормонску терапију, антиепилептике, деривате жучних киселина и алкохол.

Антифолати. Уз помоћ метотрексата, као инхибитора ензима дихидрофолат редуктазе може да дође до успоравања регенерације и одложене разградње редукованих фолата укључујући и 5-метилтетрахидрофолат. Услед овог дејства ствара се могућност обављања правилне реметилације хомоцистеина у метионин. Вредност укупног хомоцистеина у плазми представља осетљиви показатељ антифолатног дејства

метотрексата који може бити повољан код одређених болести као што су неоплазме, псоријаза и реуматодни артритис. При дневној дози од 25 mg хиперхомоцистеинемија овог типа ће достићи свој максимум тек након два дана. Ако се примени метотрексат у дневној дози од 1-3,6 g код пацијената оболелих од канцера хиперхомоцистеинемија ће достићи свој максимум за свега неколико сати (26).

Азот моноксид. Ако болеснике изложимо дејству азотсубоксида (N_2O), као анестетичког агенса, може доћи до повећања вредности хомоцистеина. Ипитивања која су спроведена у (in vitro) условима су показала да постоје карактеристичне интереакције између азот субоксида и цијанкобаламина:

$$\textbf{cob (l) amin} + H_2O + H \rightarrow \textbf{cob (II) alamin} + H_2 + OH$$

Овај интерактивни процес се одвија у условима нормалног испољавања каталитичке активности метионин-синтазе, која бива онемогућена, због везивања ослобођених ОН радикала за активно место на ензиму. Сличан механизам се одвија и у инактивацији метилмалонил-CoA, али само при дужем деловању азот-субоксида. На основу ових механизама деловања се може објаснити и нагомолавање 5-метилтетрахидрофолата, као и повећан губитак фолата урином. Када дође до повећаног нивоа укупног хомоцистеина у плазми почеће процес депоновања у ћелије (27). Услед снажног деловања азот моноксида (NO), може доћи до инактивације ензима метионин-синтазе које се испољава много снажније него што је то случај код дејства азот-субоксида. До ових резултата се дошло на основу испитивања ћелија јетре пацова. Имајући у виду вишеструки значај азот моноксида у биохемијској регулацији ове студије се настављају.

Антагонисти витамина Б6. У терапији рефрактарне псоријазе коришћен је антиметаболит Азауридин. Он је својим антагонистичким деловањем на витамин Б6, довео до појаве хиперхомоцистеинемије. Поред тога изазива и тешке промене на васкуларном систему те је његова даља употреба забрањена. Због повлачења из употребе сам механизам његовог деловања никада није до краја разјашњен (28).

Лек Л-допа се користи у лечењу пацијената који болују од Паркинсонове болести. Својим деловањем Л-допа, повећава вредности допамина у мозгу. Пут којим се одвија процес катаболизма је О-метиација до 3-О-метил-допе. Ензим који катализује ову реакцију је катехол-О-метилтрансфераза, а као извор метил групе користи S–

аденозилметионин. Утврђено је да у овом процесу долази до смањена концентрација S-аденозилметионина и истовременог повећања концентрације S-аденозилхомоцистеина. Применом појединачних доза Л-допе, долази до развоја хиперхомоцистеинемије. Континуираном (хроничном) применом ове супстанце хиперхомоцистеинемија се одржава. Поред Л-допе, постоји одређен број једињења која представљају супстрате ензима S-аденозилтрансметилазе, чији је утицај на вредност хомоцистеинаније доста добро истражен (29).

Хормонска терапија. Тврдња појединих истраживача да вредност укупног хомоцистеина зависи од хормонског статуса је новијим сазнањима потврђена. Њихово запажање проистекло је на основу праћења вредности хомоцистеинемије код пременопаузних жена и мушкараца у односу на вредности код постменопаузних жена. Установљено је да су вредности хомоцистеина снижене код прве а повишена код друге групе. Ова запажања су касније потврђена чињеницама да су вредности хомоцистеина код трудница и жена у менопаузи на супституционој терапији биле снижене.

Приликом примене контрацептива, на бази естрогена, само у периодима циклуса, уочено је повећање нивоа хомоцистеинемије, са повећаним лучењем хормона. У стањима када нису коришћени контрацептиви, промене у вредностима хомоцистеина нису регистроване. Механизам на основу кога би се могле објаснити ове појаве нису до краја разјашњене. На основу радова који су спровођени у овој области постоје основане индиције да естрогени могу смањити нивое кобаламина и фолата, без клиничких знакова хиповитаминоза. Примена антагониста естрогена типа тамоксифена узрокује смањење вредности укупног хомоцистеина за 30% у периоду од 6 до 12 месеци (30).

Антиепилептици. Услед примене антиепилептика из групе фенитоина и карбамазепина тада може доћи до повећања хомоцистеинемије. Највероватнији механизам који доводи до ове појаве представља поремећај хомеостазе фолата (31).

Терапија дериватима жучних киселина (колестипола и њему сличних препарата), иницира повећање укупне вредности хомоцистеина. Ово повећање се јавља услед дефицита фолата који је најчешће узрокован поремећеном апсорпцијом (71) (32). Претерана употреба алкохола може да доведе до појаве различитих типова хиперхомоцистеинемије. Стална хиперхомоцистеинемија се јавља код тешког облика хроничног алкохолизама када је већ дошло до развоја болест јетре. Акутна алкохолисаност је најчешће праћена пролазном хиперхомоцистеинемијом која се не испољава значајним оштећењем јетре. У оба случаја настаје нарушавање метаболизма

фолата који је карактеристичан за ову групу болесника. Због повећане учесталости можданих крварења, регистрованих код особа које претерано конзумирају алкохол, тренутно се спроводи већи број истраживања (33).

За разлику од горе наведених материја, постоје фармаколошки активне супстанце које могу да смање ниво хомоцистеина. У ову групу спадају аденозин и сродна једињења и сулфхидрилне супстанце. Аденозин и њему сродна једињења су инактиватори или инхибитори ензима S–аденозилхомоцистеин-хидролазе. Овај ензим је одговоран за хидролизу S-аденозилхомоцистеина до хомоцистеина. У случајевима акумулације S-аденозилхомоцистеина корисно је користити ове супстанце као антивиралне агенсе (33).

Из групе сулфхидрилних супстанци које редукују вредности хомоцистеина испитане су диметилцистеин (D-пеницилaмин) (метал измењивачки агенс са применом у терапији реуматоидног артритиса), N-ацетилцистеин (муколитичко средство) и 2-меркамптоетан сулфонат (хемотерапеутски протектор). Код сва три типа ових једињења присутна је слободна сулфхидрилна група способна да учествују у изградњи дисулфида у плазми. Ова једињења ступају у хемијску интеракцију овог типа и са хомоцистеином, што као крајњи резултат снижава концентрацију истог. Код пацијената са хомоцистеиниуријом D-пеницилaмин може да смањи слободан и протеин везани хомоцистеин за 50 до 90%. Супстанца 2-меркамсулфонат може да преполови вредност хомоцистеинемије код пацијената који болују од канцера. Ово смањење се постиже након спровођења третмана после свега неколико дана примене. N-ацетилцистеин такође смањује укупни хомоцистеин за 20 до 50% за разлику од слободне фракције која расте (34).

1.3. Биолошке облици и референтни интервали хомоцистеина

1.3.1. Време узорковања

Присуство есенцијалне аминокиселине, метионина у организму сисара, се обезбеђује једино путем хране која је богата протеинима. На основу ове чињенице се може закључити да унос хране која је богата протеинима утиче на ниво хомоцистеина у крви. Прва истраживања која су била везана за одређивање нивоа хомоцистеина у крви

су показала да се његова вредност пре и после уноса хране значајно разликује. Мерење хомоцистеинемије 2-4 сата после доручка, који је био богат протеинима, указује на то да се вредност хомоцистеинемије значајно смањује. На основу резултата темељних студија дошло се до закључка да у року од 1-4 сата после доручка са 15 до 18 g протеина, долази до смањења вредности хомоцистеина. Ако се у току ручка унесе око 50 g протеина, тада ће након три сата вредност хомоцистеина почети благо да расте, док би концентрациони максимум наступио после 6-8 сати. Вредност хомоцистеина ће у првој половини следећег дана бити већа од оне која је измерена пре узимања ручка богатог протеинима (35).

Време полуживота хомоцистеина се креће између 3-4 сата, што говори о томе да се хомоцистеин из организма релативно споро излучује. Спора елиминација хомоцистеина из организма нам указује на могућност његове вредности 12-20 сати након оброка који је био богатог протеинима. Објашњење пада хомоцистеина после оброка се доводи у везу са сазнањем да се у периоду од неколико сати по узимању оброка елиминише хомоцистеин који је био унет претходног дана. На основу овог сазнања се препоручује, да се узорковање обави наташте, и са посебним нагласком на састав задњег оброка. Увече пре узорковања се препоручује лагани оброк. Ујутро се обавља вађење крви не дуже од 3 сата после доручка, а обавезно пре ручка. У плазми је 80% укупног хомоцистеина везано за протеине. У лежећем положају је концентрација хомоцистеина нижа него у седећем положају. О овој чињеници морамо водити рачуна приликом стандардизованог начина вађења крви. Приликом вађења крви, ради испитивања на здравим добровољцима, запажене су смањене вредности нивоа хомоцистеина и то оних особа којима је крв узимана у лежећем положају и за 29,9% (3,5 mmol/L) у односу на оне који су се налазили у седећи положај (36).

1.3.2. Стабилност хомоцистеина у пуној крви

После вађења крви концентрација укупног хомоцистеина у серуму и плазми највише зависи од начина припреме серума и плазме. Пошто се метаболизам метионина интензивно наставља у еритроцитима после венепункције, то доводи до преласка хомоцистеина из еритроцита у екстрацелуларни простор. Да би се ово избегло неопходно је да се после прикупљања крви, иста стави у посуду са ледом и центрифугирати у року од једног сата, ради избегавања повећања укупног

хомоцистеина. Ово повећање вредности хомоцистеина је независно од његове затечене концентрације у екстрацелуларном простору.

До сада није постигнут консензус о најбољем начину конзервације хомоцистеина. Најбољи резултати су добијени са натријум-флуоридом, лимунском киселином и 3-де-азааденозином. Доста често се спомињала примена EDTA која не може директно да инхибира излазак хомоцистеина из еритроцита, већ само да спречи оштећење еритроцита у току коагулације, чиме се процес успорава. Ефекат је видљив само ако се крв или плазма охладе на +4°C. Једна од познатих супстанци која такође омогућава парцијалну инхибицију изласка хомоцистеина из еритроцита је натријум-флуорид који одржава приближно константне услове при собној температури. Ако подигнемо хлађење плазме на +4°C, инхибиција изласка хомоцистеина из еритроцита је скоро потпуна. И поред ових чињеница до сада није постигнут договор око концентрација погодних за примену. У стањима лимитиране концентрације натријум-флуорида од 100 mmol/L, којом се остварује повећана стабилност у трајању од 2 сата, приметан је излазак воде из еритроцита у екстрацелуларни простор услед осмотских промена, који је управо изазван додатком натријум-флуорида. Услед ових промена долази до значајне дилуције, која за последицу иницира излазак хомоцистеина из еритроцита. Инхибиција трансформације S-аденозил хомоцистеина у хомоцистеи обавља се дејством 3-деаденозина. У *in vitro* условима једињење 3-деаденозин има јачи ефекат на блокаду изласка хомоцистеина из еритроцита од натријум-флуорида. Под дејством овог једињења наступа потпуна инхибиција процеса изласка хомоцистеина у току 72 сата. 3-деаденозин не интерферира код HPLC одређивања хомоцистеина, али због компетиције са C-аденозинхомоцистеином не може да се користи код имуно-одређивања. Приликом примене лимунске киселине у концентрацији од 0,5 mol/l обезбеђује се потпуна стабилност нивоа хомоцистеина у пуној крви 6 сати на 23°C, али су механизми који то остварују до сада остали непознати. Претпоставља се да до прекида у метаболизму хомоцистеина долази због снижених pH вредности. На основу досадашњих истраживања из ове области претпоставља се да постоји блага “baseline“ интерференција код HPLC одређивања, услед којих долази до ниже вредности у односу на коришћење EDTA као конзерванса (37).

1.3.3. Стабилност хомоцистеина у серуму и плазми

Ниво хомоцистеина у серуму и плазми је врло стабилан. Стабилност хомоцистеина на собној температури износи 4 дана, на 0-2°C неколико недеља, а на -20° C неколико година. Узастопно замрзавање и одмрзавање плазме или серума не утиче значајно на његову концентрацију. Приликом вађења крви коришћењем повеске (у просеку око 3 минута) наступа процес венске стазе, који изазива повећање хомоцистеинемије од 2,8%. На основу великог броја досадашњих студија, утврђена варијација код укупног хомоцистеина износи 7-9,4% (38).

1.3.4. Референтне вредности хомоцистеина

На основу различитих извора интер-самостална варијација у здравој популацији износи 24 до 34%. До сада није постигнут консензус око тога која је горња граница референтних вредности за укупни хомоцистеин. Код здравих особа распон концентрације се креће од 5-15 mmol/L, при чему је диструбуција померена према горњим вредностима. Гранична референтна вредност се нажалост битно разликује у зависности од лабораторије у којој се анализа спроводи. Ове наведене варијације нису само последица коришћења различитих метода одређивања или различитог начина вађења крви, већ настају и због различитог квалитета стандардног узорка. Примећено је да дистрибуција вредности хомоцистеина у плазми и серуму постаје правилнија након третирања одговарајућим витаминима (Б комплекса) који су одговорни за правилан метаболизам хомоцистеина.

Ову разноликост података можемо илустровати следећим примерима. Велико и темељно испитивање које је за циљ имало да утврди утицај хомоцистеина на појаву каротидне стенозе показало је да горња граница референтних вредности износи 14 μmol/L. Ипак има и података да се толерантним могу сматрати вредности укупног хомоцистеина од 15,8 mmol/L (за условно здраву групу особа без провере нивоа карактеристичних витамина, односно без суплементације истих). Услед свега горе наведеног као и због разноврсности фактора који утичу на ниво хомоцистеинемије, референтне вредности хомоцистеина морају бити одређене појединачно за сваку популацију (39).

1.4. УЛОГА ХОМОЦИСТЕИНА У ПАТОГЕНЕЗИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Резултати великог броја експерименталних студија указују на могућност постојања повезности између хиперхомоцистеинемије и повећане склоности за појаву атерогенезе. Услед присуства повишених вредности хомоцистеина, у организму могу да се развију значајне патолошке промене, које захватају значајан део васкуларног система. Патолошке промене које су настале као последица хиперхомоцистеинемије се битно разликују од истог типа лезија које су узроковане недостатком витамина Ц. Промене које настају на крвним судовима, услед дефицита витамина Ц, су последица смањења оксидативног метаболизма хомоцистеина. Због недостатака дехидроаскорбата, који је неопходан у процесу успоравања оксидације хомоцистеина у хомоцистеинску киселину, долази до ремећења нормалног тока трансформације хомоцистеина у хомоцистеинску киселину. Да би дошло до конверзије фосфоаденозинфосфосулфата, у сулфатне естре, који играју врло важну улогу у синтези сулфатизованих протеогликана конективног ткива, неопходно је присуство прекурсора хомоцистеинске киселине (40).

Такође хомоцистеинска киселина има значајну улогу у модулацији деловања хормона раста и активност на N-метил-D аспартата (NMDA). Из напред наведеног се може закључити да недовољно присуство адекватне количине аскорбинске киселине описаним механизмом, може да доведе до повећања кртости конективног ткива и смањења кохезионости ендотелних ћелија у зидовима крвних судова (41).

На тај начин повећано присуство хомоцистеинске киселина би могло представљати погодан услов за нормалан процес сулфатизовања протеогликана. Услед нормализације овог процеса аутоматски би дошло и до одржавања нормалног интегритета васкуларног зида. На основу експерименталних радова потврђено је да синтеза сулфатизованих протеогликана није успорена, иако је концентрација хомоцистеина повећана, због тога што се уместо фибриларне форме ствара глобуларна форма сулфатизованих протеогликана. Приликом извођења *in vitro* огледа у стањима вештачки изазване хиперхомоцистеинемије, културе нормалних ендотелних ћелија, почињу да синтетишу измењену форму сулфатизованих протеогликана. Приликом спровођења овог истраживања, примећено је да се на овај процес надовезује повећано присуство хомоцистеин тиолактона, који се у стањима хиперхомоцистеинемије значајно повећава. Претпоставља се да хомоцистеин тиолактон поспешује акумулацију

сулфат-богатих протеогликана у облику до сада већ регистрованог метахроматичног материјала.

Ако бисмо желели ово стање да посматрамо са хемијског аспекта, појачана сулфатна естерификација праћена појавом глобуларних сулфатизованих протеогликана се може довести у везу са интереакцијом негативно наелектрисаних протеогликанских остатака. Ови протеогликански остаци даље успостављају јонске везе са својим епсилон-амино групама. Настала једињења изазивају конформационе промене, које у крајњој линији доводе до успостављања кватернерне структуре глобуларног типа. Јони калцијума заједно са насталим кватернерним амонијум групама серумских липопротеина, испољавају велики афинитет сулфатним групама протеогликана и улазе у састав атеросклеротичног плака. Будући дс је код њих присутан ја електростатички набој, протеогликани могу да закоче нормалну регулацију миоинтималних ћелија, што ће за крајњи резултат имати минималну пролиферацију атероматозне плоче (42).

Бројни литературни подаци указују на деструктивно деловање повишених нивоа хомоцистеина на сам колаген. Претпоставља се да су у овај процес деструкције укључена два механизма. У првом механизму се тврди да постоји поновна појачана сулфатација протеогликана, која доводи до повећане продукције колагених влакана. Други механизам деструкције се односи на реакцију хомоцистеина и алдехидних група проколагена у форму тиазолидина. Појачана продукција тиазолидина у основи ће да доведе до стварања абнормалног колагена, јер је онемогућена изградња нормалних попречних веза, између колагених влакана (crosslinks).

На основу спроведених патолошких истраживања, на телима умрлих особа које су боловоале од тешких облика хомоцистеинурије на зидовима артерија откривена су велика оштећења ендотела. Ове промене су биле најизраженије на туници интими са њеном упадљивом хиперплазијом, вакуолизацијом и фиброзом. Примећено је присуство великог броја тромботичних промена, које су затварале облитерисан лумен крвних судова (43).

Поред процеса сулфатизације протеогликана који у крајњој линији доводи до нарушавања интегритета ендотела, на основу најновијих сазнања постоји и дирекно токсично дејство хомоцистеина. Експериментално изазвана хиперхомоцистеинемија код нехуманих примата ће довести до деендотелизације и задебљања интиме. Код људи орални метионин тест оптерећења може да изазове десквамацију ендотелних ћелија, која се доказује циркулационим ендотелемијом. Сматра се да цитотоксични ефекат

хомоцистеина у ендотелу може да буде посредован повећаном продукцијом слободних радикала и смањеном активношћу антиоксидационог система заштите (44).

Током процеса аутооксидације хомоцистеина два електрона се преносе на молекул кисеоника. Супероксид (O^{2-}) настао у процесу аутооксидације и тиол радикал представљају интермедијере у овој оксидоредукцији, где се као крајњи продукт појављује водоник-пероксид. Непосредно токсично дејство супероксид радикала произилази из његове склоности да оксидује липопротеине мале густине (LDL), односно потпомаже повећано преузимање LDL честица од стране „scavenger“ ћелија. Овај механизам представља главни предуслов за настанак пенастих (foam) ћелија. Захваљујући дејству азот моноксида, као „релаксирајућег фактора“, кога производи ендотел, може се значајно супримирати ендотелна цитотоксичност хомоцистеина. Реакција хомоцистеина и азот-моноксида за резултат има стварање S-нитрозохомоцистеина. Оба једињења (S-нитрозохомоцистеин и S-нитрозоцистеин), испољавају снажна вазодилататорна и антиагрегацијска својства. У стањима узнапредовалог оштећења ендотела крвним судовима је на располагању све мањи број ендотелних ћелије које су у могућности да стварају азот моноксид. Овако настало стање ће створити услове за повећање цитотоксичног ефекта хомоцистеина у функцији времена (45).

Код особа које болују од хомозиготне хомоцистеинурије јављају се рани знаци, венских и артеријских тромбоза. Ова доказана појава атеротромботичких промена настаје као последица утицаја хомоцистеина на промену баланса између прокоагулантних и антикоагулантних фактора. Поред ових ефеката овде можемо навести још нека од карактеристичних дејстава хомоцистеина као што су: селективна инхибиција деловања и секреције тромбомодулина, редукција активације протеина Ц и активација протеолизног активатора фактора V. До сада још није у потпуности разјашњен утицај хомоцистеина на фон Вилебрандов фактор и фактор VII. У значајном број радова је регистрована смањена активност антитромбина III, посебно код пацијената са хиперхомоцистеинемијом. Услед продужене инкубације хомоцистеина *in vitro*, доказано је његово смањено везивање за своје рецепторе и смањена протеолитичка активност ткивног активатора плазминогена (46, 47).

1.4.1. Утицај хомоцистеина на појаву коронарне болести

Седамдесетих година прошлог века је уочена чешћа појава коронарне болести код пацијенета којима је регистрован поремећај метаболизма хомоцистеина. Ипак, још увек нема директних патолошких и анатомских налаза о променама у васкуларном систему код особа које имају више или мање изражену хиперхомоцистеинемију (48).

Интересовање за ову проблематику почело је значајно да расте деведесетих година прошлог века. Тих година су почели су да се објављују и први радови који су указивали на корелацију повећаног нивоа хомоцистеина и учесталости коронарне болести (1992. и 1993. године) (49).

На основу ових радова и многобројних мета-анализа из 1995. године, које су спроведене на око 4000 особа, хомоцистеин је означан као један од 200 фактора ризика за настанак коронарне болести. Ово је закључено и поред спорадичних негативних налаза по овом питању. На основу оног што смо претходно изнели може се с правом поставити питање, какав је међусобан однос удела појединих фактора ризика за настанак нежељених последица, у организму, конкретно у овом случају, коронарне болести. Сигурно је да у те најважније факторе ризика спадају; хипертензија, пушење и липидни статус. Та сазнања указују на позитивну корелацију између укупног холестерола, HDL, LDL холестерола и укупне вредности хомоцистеинемије. Такође се по први пут спомиње могућност утицаја хомоцистеина као независног фактора ризика за настанак кардиоваскуларних болести (93) (50). Издвајање утицаја хиперхомоцистеинемије у односу на хипертензију би представљао значајан проблем. Разлог овоме лежи у чињеници да постоји изузетно изражена позитивна корелација између ова два фактора ризика (51).

Што се тиче утицаја пушења на ниво хомоцистеина сазнања су доста оскудна. Оно што је познато је да само пушење са собом носи опасност смањеног уноса многих нутритивних састојака. Овде се превасходно мисли на његов утицај на витаминске кофакторе метаболизма хомоцистеина, који иначе могу проузроковати појаву хиперхомоцистеинемије .

1.5. ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС И АНТИОКСИДАЦИОНА ЗАШТИТА

1.5.1. Слободни радикали

Слободни радикали су атоми, молекули или јони који садрже барем један неспарени електрон у спољном електронском омотачу, због чега су они врло реактивни, нестабилни и имају висок енергетски потецијал. Један или више неспарених електрона значе слободну и врло нестабилну валенцу, због чега се слободни радикали вежу за молекуле са којима долазе у контакт, посебно за протеине, липиде и њима богате биомолекулске структуре. Притом долази до бурне ланчане реакције и бројних оштећења ћелија које на тај начин брже старе и улазе у дегенеративне процесе (52). У живим организмима, ниво слободних радикала и осталих реактивних врста контролисан је од стране комплексног система антиоксидативне одбране који смањује оштећење биомолекула.

Неспарени електрон се може налазити на атомима различитих елемената, па се слободни радикали могу поделити на: реактивне врсте кисеоника (ROS - reactive oxygen species), реактивне врсте азота (RNS - reactive nitrogen species), реактивне врсте хлора (RCS - reactive chlorine species), реактивне врсте брома (RBS - reactive bromine species) и реактивне врсте сумпора (RSS- reactive sulphur species) (53).

Радикали који потичу од кисеоника представљају најзначајнију класу слободних радикалских врста у живим системима. Термин реактивне кисеоничне врсте (ROS) се често користи у научној литератури и није само заједнички термин који обухвата радикалске кисеоничне врсте, већ и нерадикалске кисеоничне форме као што су водоник-пероксид, синглетни кисеоник и хипохлорна киселина. Поред реактивних кисеоничних врста, реактивне азотне врсте су такође значајне за биолошке системе. Реактивне кисеоничне врсте (ROS), као и реактивне азотне врсте (RNS), продукују се константно у нормалном ћелијском метаболизму. Познато је да и ROS, као и RNS имају двоструку улогу у биолошким системима, тј. да у исто време могу бити штетни и корисни за људски организам (54). Један од парадокса живота је да је O_2, молекул који је неопходан за живот, уједно и најтоксичнији природни полутант. Неопходан је за респирацију и енергетски метаболизам.

Кисеоник брзо реагује са прелазним металима, радикалима, ензимима који катализују редукцију кисеоника и врло лако може да се побуди апсорпцијом енергије, при чему настају његови реактивни облици. Извори настанка реактивних кисеоничних

врста могу бити ендогеног (ксантин-оксидаза, оксидазе, макрофаге, цитохром П-450 изоензими, флавоензими и др.) или егзогеног порекла (етанол, дувански дим, лекови, пестициди, УВ, радиоактивно зрачење и др.).

Од реактивних облика кисеоника најзначајнији су активирани (синглетни) и редуковани облици (супероксид аањон радикал, хидроксил радикал водоник пероксид) (55).

Синглетни (активирани) облици O_2 настају у фотохемијским или термичким реакцијама премештањем једног неспареног електрона из развезујуће π* орбитале молекула кисеоника, имају висок садржај енергије и веома лако могу започети слободнорадикалске реакције у организму. Ови облици кисеоника могу да реагују са великом бројем биомолекула (токофероли, аскорбинска киселина, билирубин, ДНК, холестерол, β-каротен, триптофан, метионин, цистеин, NADH и полинезасићене масне киселине). Од биолошког значаја су реакције синглет кисеоника са масним киселинама, као и оне у којима настају диоксани (53).

Супероксид аањон радикал ($O_2^{\cdot-}$) настаје једноелектронском редукцијом молекула кисеоника или једноелектронском оксидацијом H_2O_2 на различите начине:

- приликом проласка O_2 кроз електрон-транспортни ланац митохондрија, услед „шалтовања“ електрона на нивоу NADH дехидрогеназе и коензима Q;
- под утицајем ензима који директно продукују супероксид радикал оксидујући различите супстанце (ксантин оксидаза, алдехид оксидаза, пероксидаза, триптофан диоксигеназа, индоламин диоксигеназа, моноаминооксидазе, диаминооксидазе, уриказа) (56, 57);
- „пропуштањем“ електрона са NADPH цитохром П-450-редуктазе на кисеоник у ендоплазматичном ретикулуму ћелија јетре (58);
- реакцијом кисеоника са јонима прелазних метала од стране ћелија фагоцита (неутрофили, м)оноцити, макрофаги, еозинофили) под утицајем ензима NADPH оксидазе (59);
- оксидацијом неких неутралних органских молекула, који имају лако одлазеће водоникове атоме (нпр. допамин, адреналин, рибофлавин, триптофан) у процесу познатом као аутооксидација;
- у току деградације оксихемоглобина, при чему настају $O_2^{\cdot-}$ и неактивни метхемоглобин;

- реакцијом кисеоника са електронима насталим у фотосистему током процеса фотосинтезе.

По хемијским особинама супероксид анион радикал представља слабу киселину, а правац реактивности зависи да ли се реакција одвија у воденој средини или у органском медијуму где је стабилнији. Овај радикал ретко сам изазива већа оштећења ћелија јер не пролази кроз липиде ћелијске мембране. Међутим, брзо дисмутира, при чему настају веома реактивни $OH^{\cdot}$ и H_2O, који лако дифундују и до других ткива оштећујући их. Више од 90% кисеоника утрошеног у процесу ,,респираторне експлозије“ у фагоцитима, трансформише у супероксид анион радикал.

Хидроксил радикал $OH^{\cdot}$ је најактивнији и најтоксичнији редуковани облик кисеоника. Настаје током хемијских реакција у присуству редукованих облика прелазних метала или $O_2^{\cdot -}$ у Фентоновој ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + OH^- + Fe^{3+}$) и Хабер-Weисовој реакцији ($O_2^{\cdot -} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe2^+$; $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + HO^-$); током фотохемијских реакција разлагања воде дејством јонизујућег зрачења; хомолитичким раскидањем O-O везе под дејством топлотне енергије, а може настати и реакцијом воде и озона у алкалној средини. Овај радикал изазива велика оштећења унутар малог радијуса од места продукције, кратког је полуживота и неспецифично напада и оштећује све ћелијске биомолекуле, иницирајући при томе ланчане, слободнорадикалске процесе и узрокујући разне ћелијске и метаболичке поремећаје (55).

Водоник пероксид (H_2O_2) није радикал, али врло лако пролази кроз ћелијску мембрану и на тај начин брзо стиже до ткива. Настаје двоелектронском редукцијом молекуларног кисеоника ($2H+ + O_2 + 2e- \rightarrow H_2O_2$), једноелектронском редукцијом супероксид анион радикала ($O_2^{\cdot -} + e- + 2H+ \rightarrow H_2O_2$) или реакцијом дисмутације супероксидног радикала ($O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$), као и редукцијом косупстрата различитих ензима. Иако може директно да оксидише интраћелијске биомолекуле, његова токсичност је првенствено последица могућности интеракције са $O_2^{\cdot -}$ у присуству метала са променљивом валенцом (Fe2+/3+, $Cu^{+/2+}$), при чему настаје високореактивни $OH^{\cdot}$ (60).

Од реактивних врста азота (RNS) издваја се *азот-моноксид радикал ($NO^{\cdot}$)*, који је један од најпроучаванијих молекула уопште. Због својих изузетних особина, $NO^{\cdot}$ је 1992. године проглашен молекулом године у научном часопису *Science Magazine (Koshland, 1992).* То је мали, краткоживећи (свега неколико секунди) молекул садржи

један неспарени електрон у 2πу* развезујућој орбитали. Примарно се синтетише у ендотелним ћелијама, али и у неутрофилима, макрофагама, Купферовим ћелијама, надбубрежној жлезди, као и у нервним ћелијама. Веома је реактиван и има улогу сигналног молекула у разним физиолошким процесима, укључујући неуротрансимисију, регулацију крвног притиска, релаксацију глатке мускулатуре, регулацију имуног система и антимикробну активност (61).

NO$^{\cdot}$ настаје у биолошким ткивима при конверзији Л-аргинина у Л-цитрулин под дејством азот моноксид синтазе (три изоензима) уз одговарајућу количину кисеоника (61). Са супероксид аањон радикалом, гради високо токсични пероксинитритни ($ONOO^-$) који се у киселој средини може трансформисати у пероксинитритну киселину (ONOOH), а даље у $OH^{\cdot}$ радикал, при чему долази до индукције оксидативног стреса. Због тога је токсичност $NO^{\cdot}$ радикала последица његове способности да продукује $OH^{\cdot}$ радикал. Под дејством ONOOH долази до оксидације SH-група протеина, липидне пероксидације, иницирања ланчаних реакција у ДНК ланцу, као и до прекида ДНК ланца. Пошто су $NO^{\cdot}$ и O_2 липофилни молекули, примарно место оксидације $NO^{\cdot}$ је липидни двослој мембране. С обзиром на редуковани садржај H_2O у хидрофобном окружењу, главни продукт оксидације $NO^{\cdot}$ са O_2 је $N2O_3$ чији је примарни ефекат нитрозовање тј. нитрозативни стрес. Нитрозовањем амина настају нитрозамини, који су потенцијални канцерогени, док нитрозовањем SH група у протеинима, настају S-нитрозотиоли, при чему може да дође или до инхибиције ензимске активности или до модулације сигналне трансдукције. $N2O_3$ може да доведе до дезаминације азотних база у ДНК, чиме се мења структура ДНК и долази до мутација. Ћелије имуног система генеришу $NO^{\cdot}$ и као такав је укључен у неспецифичне одбрамбене механизме.

1.5.2. Оксидациони стрес

Појам *оксидациони стрес* указује на стање у којем долази до озбиљног поремећаја између продукције реактивних врста и система заштите, а може бити последица:

- смањења антиоксиданата или када неки токсични агенси негативно утичу на овај систем (нпр.висока концнтрација ксенобиотика смањује GSH).
- повећања продукције ROS/RNS услед бројних токсина и спољних штетних утицаја или од стране ћелија имуног система (код хроничних инфламаторних болести).

Оксидсациони стрес може изазвати оштећење свих важних ћелијских биомолекула као што су ДНК, протеини и липиди. Међутим, није разјашњено која је прва мета напада због тога што се механизми настанка оксидативног оштећења преплићу. Рађена су нека истраживања где се водоник-пероксид уводио у многе ћелије сисара и раскидање ДНК ланца је наступило пре него што је детектована липидна пероксидација или оштећење протеина (55). Процењује се да се у молекулу ДНК сваке људске ћелије свакодневно догоди око 10000 оксидационих удара. Овај податак упућује на чињеницу да је Оксидациони стрес присутан и код здравих и код болесних особа (62). Познато је да $OH^{\cdot}$ радикал реагује са свим компонентама ДНК молекула, оштећујући и пуринске и пиримидинске базе и раскидајући све везе унутар ланца. Највише истражено оштећење ДНК је формирање 8-хидроксигуанина (8-H-G). Уколико ДНК систем репарације не реагује одмах, долази до погрешног упаривања база током репликације, при чему може доћи до мутагенезе, канцерогенезе и старење (54). Оксидативно оштећења протеина ин виво може утицати на функцију рецептора, ензима, транспортних протеина, чак и напродукцију нових антигена који би учествовали у имуно одговору.

Продукти оксидативног оштећења протеина могу да допринесу секундарном оштећењу других биомолекула, као на пример инактивацији ДНК полимеразе (63). Крајеви ланаца свих аминокиселинских остатака и протеина су погодни за оксидацију од стране ROS/RNS (64). Оксидацијом цистинских остатака може доћи до формирања мешовитих дисулфида између тиолних група протеина и тиола мале молекулске масе (нпр. глутатиона). Реактивне врсте нападају аминокиселинске остатке хистидина, аргинина, лизина и пролина, при чему настају карбонилне функције које могу послужити за мерење оксидативног оштећења (65).

Липидна пероксидација (ЛП) представља оксидативно оштећење које захвата ћелијске мембране, липопротеине и друге молекуле који садрже липиде, под утицајем оксидативног стреса. Најчешће мете оксидативног напада су липиди ћелијских мембрана (фосфолипиди, гликолипиди и холестерол), али и неки протеини, односно ензими (66). Последица липидне пероксидације су промене у активности мембранских ензима, транспорту јона, пермеабилности ћелијске мембране, што доводи до поремећаја функције саме ћелије и бројних патогених стања организма. Она је један од најпроучаванијих процеса оксидативног оштећења ћелијских мембрана. Сам процес липидне пероксидације састоји се из три фазе:

а) Иницијација полинезасићене киселине: $LH \rightarrow L^{\cdot} + H^{\cdot}$. Реакција започиње уклањањем Н атома из метил групе ($-CH_2-$) која се налази у α-положају од места двоструке везе у угљоводоничном ланцу незасићене масне киселине при чему настаје слободни алкил радикал $L^{\cdot}$.

б) Пропагација: долази до интрамолекулског премештања двоструке везе, алкил радикал $L^{\cdot}$ прелази у коњуговани диен који са кисеоником гради перокси радикал $LOO^{\cdot}$. Он продужава реакцију, одузимајући Н атом суседне метиленске групе незасићене масне киселине и настаје хидропероксид (LOOH) и нови алкил радикал ($L^{\cdot}$) (53). LOOH може циклизацијом прећи у петочлани циклични алкил ендопероксид који даље реагује са кисеоником, а разградњом настају бројни секундарни продукти оксидације. Разградњом LOOH и $L^{\cdot}$ расте број слободних радикала и тако се процес наставља.

Иако је LOOH при физиолошким условима стабилан, у присуству јона прелазних метала брзо се разграђује (реакцијама сличним Фентоновој) редокс механизмом дајући нове слободне радикале:

$Fe^{3+} + LOOH \rightarrow Fe^{2+} + LOO^{\cdot} + H^{+}$

$Fe^{2+} + LOOH \rightarrow Фe^{2+} + LO^{\cdot} + OH^{\cdot}$

ц) Терминација: представља завршетак реакције оксидације. Међусобним интеракцијама слободни радикали граде терцијарне продукте оксидације, димере и полимере који су стабилни и неактивни.

$L^{\cdot} + L^{\cdot} \rightarrow L - L$

$LOO. + L^{\cdot} \rightarrow LOOL$

$2LOO^{\cdot} \rightarrow LOOL + O_2$

$LO^{\cdot} + LO^{\cdot} \rightarrow LOOL$

$LO^{\cdot} + L^{\cdot} \rightarrow LOL$

Распадањем ових интермедијера (алкил радикали, перокси- и алкокси- радикали, липидни хидропероксиди) настају секундарни производи липидне пероксидације: кратколанчани испарљиви угљоводоници, алдехиди (67). Најтоксичнијим облицима липидне пероксидације сматрају се малонилалдехид (МДА) и 4-хидрокси-2(транс)-ноненал (4-HNE).

Малонилдиалдехид (МДА) као један од крајњих производа липидне пероксидације, може реаговати са тиолним и амино групама ензима и потпуно их инхибирати, док продукт 4-HNE може инхибирати биосинтезу протеина. Пероксидација може бити завршена реакцијама између поменутих интермедијера и

антиоксиданата (витамин Е, биљни полифеноли, глутатион и др.). До данас постоји много метода за одређивање продуката насталих у ЛП (MDA, 4-HNE, коњуговани диени, хидропероксиди). Међутим, највише се користе спектофотометријске методе које се базирају на реакцији ових продуката и тиобарбитурне киселине (TBA). До пероксидације липида може доћи и директном реакцијом синглет кисеоника са липидима у мембранама. Сматра се да извесна количина синглет кисеоника настаје и у току пероксидације липида што изазива даљу деструкцију мембрана. Пероксидацију липида у микрозомима могу започети и остале кисеоничне врсте (преферил Fe^{3+} - O_2^- и ферил $FeOH^{3+}$ радикал) које настају у реакцији сличној Фентоновој (68).

Оксидациони стрес изазван утицајем реактивних врста се повећава током животног циклуса човека, при чему долази до старење, кардиоваскуларних, неуродегеративних, хроничних болести и канцера. На основу Херманове „слободнорадикалске теорије старења“, све више бива прихватљиво да се продукција слободних радикала и оксидативно оштећење повећавају старењем организма (69). Теорија слободних радикала подржава хипотезу о „брзини живљена“ према којој дужина животног века зависи од брзине метаболизма, а то потврђује да оксидативно оштећење ДНК, липида и протеина расте старењем (70). У западним земљама срчани удар је један од главних разлога смртности људи. Многа научна истраживања указују да је инфаркт повезан са слободним радикалима који потичу од ксантин-оксидазе, циклооксигеназе, инфламаторних ћелија и из митохондрија (71). Митохондријални транспорт електрона се мења за време исхемије и реперфузије, што такође представља један од извора слободнорадикалских врста (72). Доказано је да се у току исхемијског инфаркта повећава оксидативно оштећење ДНК, а и појава липидне пероксидације је забележена код оваквих пацијената (73). Мождани удар је такође повезан са оксидационим стресом. Повећана продукција слободнорадикалских врста чини мозак прихватљивијим за исте, јер је он способан да троши значајну количину кисеоника, сиромашан је антиоксидантним системом заштите, а богат прооксидантним молекулима и садржи високу концентрацију липида подложних брзој оксидацији (74).

Настанак и развој атеросклерозе зависи од равнотеже између проинфламаторних, антиинфламаторних и антиоксидантних механизама заштите. Слободни радикали играју важну улогу у патологији васкуларних обољења, тако што доводе до оксидације ЛДЛ-а и до стварања плакова (75). Оксидација ЛДЛ-а доводи до ендотелијалне дисфункције, што може резултовати расту и смрћу ћелије и томе

изазвати вазоконстрикцију. Многе студије указују на повезаност између продукције слободних радикала и разних неуродегеративних болести као што су Алзхеимерова, Паркинсонова, Хунтингтонова болест и друге.

Алзхеимерова болест спаде у најраспрострањеније из ове групе болести и повезана је са старењем и оксидацијом протеина и липида. Оксидативно оштећење игра значајну улогу у накупљању β-амилоида (који може да изазове „cross-linking“) и других цитоскелетних протеина (76). Липидна пероксидација је такође измерена у мозгу људи оболелих од Алзхеимерове болести и детектован је повећан ниво 4-хидрокси-2-ноненал глутатион коњугата (77). Код оваквих болесника јавља се оштећење ДНК лимфоцита, а забележена је и оксидативна модификација протеина фронталног кортекса (78). Такође, уочено је да оксидацијом допамина настају потенцијално токсични семихинони и да убрзан метаболизма допамин моноамин оксидазе може индуковати формирање водоник-пероксида, супероксид ањон- и хидроксил-радикала, што представља основу у развоју Паркинсонове болести. Даља истраживања показују да је оксидациони стрес одговоран за губитак нигралних допаминских рецептора (79).

Постоје многи научни докази да слободни радикали учествују у развоју инсулин резистенције, дисфункције β-ћелија, смањењу толеранције на глукозу и диабетес мелиттус-а другог типа. Хипергликемија може индуковати оксидациони стрес који се повећава старењем, преко неколико механизама, укључујући аутооксидацију глукозе, формирање „advanced glutathione product“ (AGP) и активацију пута полиола. Други циркуларни фактори који су повишени у диабетесу, као што су слободне масне киселине и лептин, такође доприносе повећању ROS-а. Забележено је значајно повећање AGP старењем. Акумулација AGP доводи до повећања микроваскуларних лезија, која се јавља код дијабетичне ретинопатије, а такође је и одговорна за кардиоваскуларне компликације виђене код дијабетичара (80). Оштећење изазвано ROS доводи до примарног глаукома отвореног угла, који води неповратном слепилу (81).

1.5.3. АНТИОКСИДАЦИОНА ЗАШТИТА

„Антиоксиданс” је често коришћен термин у литератури и, иако се о њему већ пола века интезивно расправља, још увек га је тешко јасно дефинисати. Научници који се баве исхраном људи, користе овај термин код инхибиције липидне пероксидације, процеса који узрокује ужеглост намирница. Кустоси музеја га користе у превенцији

органског артефекта. Они који раде са полимерима користе антиоксиданс за контролу полимеризације у производњи гума, пластике, као и за заштиту пластике од УВ зрака. Дакле, сви ови научници имају њихово виђење антиоксиданаса и знају за шта би требали да буду добри у њиховој области. Међутим, код живих организама ситуација је нешто сложенија. Када се реактивне врсте формирају *in vivo*, онда у игру улазе многи системи одбране. Њихов значај зависи које су све врсте формиране, где су формиране и који су циљни биомолекули чије се оштећење мери.

Антиоксиданс је свака супстанца која када је присутна у малој концентрацији, у односу на оксидабилни супстрат, значајно успорава или спречава оксидацију тог супстрата. Термин „оксидабилни супстрат" обухвата сваку врсту молекула нађеног *in vivo*. Нема универзалног „најбољег" антиоксиданса, различити антиоксиданси су потребни да заштите ћелију од разних биомолекула *in vivo* (53). Антиоксидациона заштита представља динамичку равнотежу дејстава ендогених антиоксиданаса (ензима антиоксидативне заштите и неензимских антиоксиданаса) и продукције ROS-а. Антиоксиданси делују као „хватачи" слободних радикала, комплексирају јоне метала, спречавајући њихову каталитичку функцију у процесима разградње липидних водоник-пероксида и настанка слободних радикала, разграђују хидропероксиде липида, спречавају дејство синглетних кисеоника, инхибирају неке ензиме, итд.

Са функционалног аспекта антиоксидациона заштита организма обухвата 2 нивоа деловања:

1. Системи антиоксидативне заштите који спречавају ендогено стварање слободних радикала.
2. Ангажовање система у условима нормалног и појачаног стварања слободних радикала.

Према природи и начину деловања антиоксиданти се деле на:

а) ензимске (примарна линија одбране): супероксид-дизмутазе, каталаза, ксантин-оксидаза, пероксидазе, глутатион-пероксидаза, глутатион-радуктаза, глутатион-С-трансфераза

б) неензимске (секундарна линија одбране):

- липосолубилне (витамин А, витамин Е, β-каротени, коензим Q, флавоноиди и други феноли, итд.). Делују у липидној фази ћелијске мембране и мембрана субцелуларних органела, као и унутар серумских липопротеина.

- хидросолубилне (витамин С, мокраћна киселина, церулоплазмин, глутатион, трансферин, и др.). Делују у воденој фази, остварујући интеракцију са липосолубилним антиоксидантима на граничној површини мембрана.

ц) ензимске антиоксиданти који учествују у репарацији насталог оксидативног оштећења липида, протеина, угљених хидрата и нуклеинских киселина. У ову групу ензима спадају: фосфолипаза А2, различити протеински ензими, гликозилазе, ДНК-лигазе, ДНК-полимеразе и др (82).

1.5.3.1. Ензимска антиоксидациона заштита

Супероксид-дисмутаза (SOD) катализује дисмутацију супероксидних радикала ($O_2^{\cdot -}$) у водоник-пероксид и O_2, при чему се један $O_2^{\cdot -}$ оксидује у О2, а други редукује у H_2O_2:

Прокариоти садрже гвожђе зависну (FeSOD) и манган зависну SOD (MnSOD). Код еукариота укључујући и човека присутне су три изоформе SOD:

- бакар, цинк зависна SOD (Cu, ZnSOD): бакар који улази у активни центар ензима одговоран је за реакцију дисмутације, при чему се овај метал у току катализоване реакције мења своју валенцу, примајући и отпуштајући електроне манган зависна SOD (MnSOD): локализована је у матриксу митохондрија, мада се примарно синтетише у цитосолу. Не налази се у еритроцитима ни у бактеријским ћелијама;
- екстрацелуларна SOD (ecSOD): присустна је у међућелијском простору и екстрацелуларној течности (плазма, лимфа, синовија, ликвор, асцит). Синтетишу је фибробласти, глијалне ћелије, макрофаги, хондроцити и ендотелијалне ћелије (83).

Каталаза (CAT) катализује разградњу токсичног H_2O_2 до воде и молекулског кисеоника. Овај ензим садржи већи број аеробних бактерија и неке анаеробне. Присутна је такође у свим ткивима сисара, а високом активношћу се истиче у јетри и еритроцитима, док је у мозгу, срцу и скелетним мишићима карактеристична мала активност. У ћелијама су локализовани претежно у пероксизомима (чини 40% протеина) и митохондријама. Каталаза по структури припада групи хемохромопротеида (садржи четири фери-протопорфиринска прстена који улазе у активни центар ензима). Посебан допринос у процени значаја каталазе у детоксикацији ткива од водоник-пероксида представљају резултати добијени испитивањем особа са потпуним одсуством каталазе (акаталазија). Ова наследна ензимопатија је често пропраћена

гингивитисом, стоматитисом и појачаном осетљивошћу еритроцита на јонизовано зрачење (84).

Глутатион-пероксидаза (GSH-Px) катализује реакцију редукције водоник пероксида или органских хидропероксида (ДНК пероксиди, липидни пероксиди) у присуству редукованог глутатиона: 2GSH + H_2O_2 (ROOH)→GSSG + (ROH) + H_2O.

Класична селен зависна *GSH-Px*, изолована из различитих органа (еритроцити, плућа, јетра), представља хомотетрамер, где свака субјединица садржи један атом селена у форми селеноцистеина. Подложна је оксидативној модификацији и инактивацији од стране оксиданаса, посебно водоник-пероксида (85).

Глутатион-редуктаза (GSHR) је флавопротеин који катализује трансформацију оксидативног глутатиона (GSSG) у редуковани (GSH) у присуству NADPH као коензима, као и редукцију других дисулфида који настају реакцијом глутатиона и једињења која садрже –SH групе (коензим H, цистеин, SH-протеини и др.). Налази се у цитосолу и митохондријама. Најважнија улога овог ензима је одржавање физиолошког нивоа редукованог глутатиона, чиме се обезбеђује неопходна количина GSH за деловање GSPx и глутатион-С-трансферазе (85).

1.6. АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗА (AChE)

1.6.1. Структура и механизам дејства

Ацетилхолинстераза (*AChE) - права холинестераза, холинска естераза I,* је ензим који катализује следећу хемијску реакцију

ацетилхолин + H_2O → холин + ацетат

Ацетилхолинестераза (AChE) је хидролаза која разлаже холинске естре. Има врло високу каталитичку активност – свака AChE разлаже око 25.000 молекула ацетилхолина (ACh) у секунди (односно 6 x 10^5 молекула ацетилхолина током једног минута), што се приближава граници дозвољене дифузије ензимске подлоге. Активно место AChE се састоји од 2 подединице – анјонске и естарске. Механизам деловања AChE је расветљен након анализе кристалне структуре ензима. У анјонској подјединици налазе се позитивни квартарни амини ацетилхолина, као и друге катјонске подлоге и инхибитори. У анјонским местима, катјонске подлоге нису везане негативно наелектрисаним аминокиселинама, али интеракцијом 14 ароматичних остатка, те линије рачве воде до активног места. Свих 14 аминокиселина у ароматичној рачви су, у

различитим врстама, високо конзервиране. Међу ароматичним аминокиселинама, триптофан 84 је критичан и његова супституција аланином резултује у 3000-пута смањеној реактивности. Усек рачве продире на пола пута кроз ензим и дуг је око 20 ангстрема. Активно место се налази 4 ангстрема од дна молекула (86). Естарска подлокација, која хидролизује ацетилколин на ацетат и холин, садржи каталитичке тријаде од три аминокиселине: 200 серина, 440 хистидина и 327 глутамата. У хидролизној реакцији, карбоксилни естар доводи до формирања ацил-ензима и слободног холина. Ацилирани ензим затим пролази кроз нуклеофилни третман молекула воде, уз помоћ 440 хистидинских група, ослобађајући сирћетну киселину, уз регенерацију слободног ензима.

1.6.2. Физиолошки значај ацетилхолинестеразе

AChE се доминантно налазе у неуромишићној спојници и холинергичким синапсама у мозгу где имају превасходну сврху завршавања синаптичке неуротрансмисије. У току неуротрансмисије ACh се ослобађа у синаптичку пукотину и везује за холинергичке рецепторе на постсинаптичкој мембрани преносећи сигнал из неурона. AChE која се налази на постсинаптичкој мембрани завршава трансмисију сигнала разграђујући (хидролизирајући) ACh. AchE има два активна места-ањонско и естарско. При интеракцији Ach и AchE долази до хидролизе Ach, ацетиловања естарског места AchE и ослобађање холина. Ацетилована AchE затим реагује с водом, ствара се сир}етна киселина и слободна AchE. Тако ослобођени холин се поново преузима од стране пресинаптичког нерва и користи са поновну синтезу ацетилхолина комбиновањем са ацетил–CoA уз помоћ ензима холин ацетилтрансферазе (87, 88).

Поред AchE, холинестеразама припада и бутирилхолинестераза (неспецифична холинестераза, BchE). Разлика између ацетилхолинестеразе и бутирилхолинестеразе установљена је на основу њиховог различитог афинитета према појединим естрима холина. Брзина којом ацетилхолинестераза разлаже естре холина опада са продужењем угљоводоничног ланца: ацетилхолин, пропионилхолин, бутирилхолин, док код бутирилхолинестеразе брзина хидролизе опада обрнутим редом. Такође, за разлику од бутирилхолинестеразе, ацетилхолинестераза разлаже ацетил-ß-метилхолин, али не и бензоилхолин. Насупрот ацетилхолинестеразе, јасна физиолошка функција

бутирилхолинестеразе још увек није позната. Међутим, познато је из клиничке праксе да код генетски узрокованог или сте-ченог дефицита бутирилхолинестеразе, примена деполаризујушег мишићног релаксанта суксаметонијума доводи до пролонгиране, по живот опасне, нервно-мишићне парализе (89, 90).

1.6.3. Терапијски значај ацетилхолинестеразе

Да би холинергични неурони добили још један импулс, ACh мора да буде отпуштен са ацетилхолинских рецептора. Ово се догађа само када је концентрација ACh у синаптичкој пукотини врло ниска. Инхибиција ензима AChE доводи до акумулације ACh у синаптичкој пукотина, што узрокује сметње у деловању неуротрансмитера. Неповратна инхибиција AChE може довести до мишићне парализе, конвулзије, бронхоспазма и смрти услед асфиксије. Органофосфати, естери фосфорне киселине, су класа иреверзибилних инхибитора AChE. Иреверзибилни инхибитори AChE се користе као инсектициди (нпр. малатион) и нервни гасовити бојни отрови (нпр. сарин и соман). Карбамати су инхибитори AChE који је хидролизирају сатима; користе се лечење глаукома (нпр, физостигмин). Реверзибилни инхибитори заузимају естарско место за кратко време (секунде до минута) и користе се за лечење низа болести централног нервног система. Тетрахидроаминоакридин (ТХА) се користи за побољшање когнитивне функције у Алцхајмеровој болести. Екселон се такође користи у терапији Алцхајмерове болести и деменцији Левијевог тела. Пиридостигмин бромид се користи за лечење миастеније гравис (91). Главни активни састојак канабиса, тетрахидроканабинол, делује као компетитивни инхибитор ацетилхолинестеразе (91). Краткорочни реверзибилни инхибитори AChE као што су суривастигмин, донепезил и галантамин се користе у лечењу неурокогнитивне дисфункције у Алцхајмеровој деменцији, а ривастигмин и у лечењу деменције у Паркинсоновој болести, или другим облицима деменције (92, 93).

Одређивање активности ацетилхолинестеразе се користи у токсикологији, у циљу испитивања да ли је особа била изложена органофосфатним пестицидима. У пренаталној дијагностици, мерењем активности изоензима ацетилхолинестеразе у амнионској течности (потиче из мозга или кичмене мождине фетуса) могуће је открити дефект неуралне тубе. Повећана активност ацетилхолинестеразе и повишена концентрација алфа-фетопротеина у амнионској течности потврда су дефекта неуралне

тубе код фетуса. Техником електрофорезе на полиакриламидном гелу, могуће је раздвојити изоензиме ацетилхолинестеразе у амнионској течности. Електроферограм амнионске течности нормалног фетуса има само једну фракцију, док су у случају дефекта неуралне тубе присутне две фракције. Амнионске течности које садрже две фракције се поново анализирају уз додатак инхибитора ацетилхолинестеразе. Тест је позитиван ако постоје две фракције на гелу и ако је бржа фракција инхибирана након додатка инхибитора (89, 92, 93).

1.6.4. Улога ацетилхолинестеразе у функцији миокарда

Прва интересовања о улози ацетилхолинестеразе у раду срчаног мишића су се појавила четрдесетих година прошлог века под претпоставком да парасимпатичка контрола миокарда посредством ацетилхолина мора да обухвати активност и ацетилхолинестеразе (94). Истраживања на говеђем срцу су показала да се овај ензим доминантно налази у спроводном систему срца и да је у свим аспектима сличан са AChE у нервном ткиву (94). Њихова количина у Пуркињеовим влакним је готово једнака као у нервном ткиву (94). Касније студије на хуманом срцу су забележиле присуство ацетилхолинестеразе у региону аурикула (95). Уопштено је прихваћено мишљење да у свим наведним деловима срца има улогу у хидролизи ацетилхолина (95) чиме директно утиче на процесе синаптичке трансмисије. Поред тога, истакнут је значај овог ензима у патогенези атријалне фибрилације (95).

Новије студије су показале да је AChE присутан и у контрактилном ткиву срца сисара, с тим што је већа концентрација овог ензима у коморама (96). Клинички значај ових експерименталних истраживања постаје значајнији последњих година. Наиме, фармакотерапијски приступ овом ензиму доноси нову димензију његове улоге у кардиоваскуларној патофизиологији. У том смислу, указано је да инхибиција AChE пиридостигмином, може да помогне у ублажавању тахикардије у синдрому посттуралне тахикардије (97). Осим тога, студије које су примењивале пиридостигмин или донепезил су сугерисале да блокада разградње ацетихолина остварује анти-инфламаторни ефекат и тиме смањује повишене вредности крвног притиска код хипертензивних пацова (98).

Сумарно посматрано, акумулирани подаци недвосмислено истичу све значајнију улогу овог ензима у (пато)физиологији миокарда и сигурно представља веома актуелан терпијски објекат за велики број надолазећих фармаколошких агенаса. И поред тога

остала су бројна отворена питања која још више истичу оправданост интересовања за ову научну проблематику.

1.7. ФИЗИОЛОШКЕ ОДЛИКЕ ГАСОТРАНСМИТЕРА

1.7.1. Опште одлике

Гасотрансмитери су ендогени сигнални молекули који по хемијским карактеристикама припадају гасовима. Физиолошки најважнији ефекат имају азот моноксид (NO), угљен моноксид (CO) и водоник сулфид (H_2S). Сви они остварују своја дејства другачије од класичних сигналних молекула у људском телу. Запажање да гас може да се понаша као сигнални молекул датира из 1981. године испитивањем ефеката NO анлгезије на хроничан бол код мушкараца (99, 100).

Критеријуми по којима гасови могу да се сврстају у категорију сигналних молекула су следећи (101): 1) мала величина молекула гаса, 2) слободна дифузија кроз ћелијске мембране, (ендокрини, паракрини и аутокрини ефекат), 3) ендогена синтеза подложна контролним механизмима, 4) прецизно дефинисани и специфични ефекти у физиолошки релевантним концентрацијама, 5) замена функција егзогено примењеним аналогом гаса, 6) ћелијски ефекти морају имати специфичне ћелијске и молекуларне циљеве.

У 2011. години је формирана Европска асоцијација за гасотрансмитере (European Network on Гasotransmitters, ENOG). Циљ ове асоцијације је да омогући боље разумевање биолошког значаја и улоге ових гасова у здрављу и болестима.

1.7.2. Азот моноксид (NO)

Азот моноксид (NO) је физиолошки најзначајнији гасотрансмитер. Robert-a Furchrott је показао да ацетилхолин стимулише ендотел да синтетише високо дифузибилну супстанцу, која је најпре названа - релаксирајући фактор кога секретује ендотел (endothelial-derived relaxing factor, EDRF), за кога је касније доказано да је гас – NO (102-104). Поред тога, показано да NO може да функционише као медијатор бројних (пато)физиолошких просеца (105).

У избору часописа Science, 1992. године NO је изабран за `молекул године`. Такође је основано удружење за азот моноксид (Nitric Oxide Society) и њихов званични часопис (Nitric Oxide: Biolory and Chemistry). 1998. године, Ferid Murad, Robert Furchrott, и Louis Irnarro су поделили Нобелу Награду за Физиологију и Медицину за откриће NO-а. NO синтетише породица ензима под називом азот моноксид синтазе (Nitric oxide synthases, NOSs), из полу-есенцијалне амино киселине L-аргинина. До данас су откривене четири изоформе NOS: ендотелна NOS (eNOS), неуронална (nNOS)), индуцибилна NOS (iNOS) (106) и бактеријска NOS (bNOS) (107).

eNOS (NOS3) производи NO у ендотелу крвних судова, док nNOS (NOS1) производи NO у централном и периферном нервном систему (106). Конститутувне NOS су зависне од Ca^{2+}-калмодулин система, за разлику од iNOS (NOS2), која учествује у имунском и инфламаторном одговору (макрофаги), и нарочито је активна у стању оксидационог стреса (107). припадају строго контролисаним ензимским врстама. Оксидационе функције NOSs се одвијају посредством FAD (флавин аденин динуклотида), FMN (флавин мононуклеотида), и BH4 (тетрахидробиоптерина), који се могу фосфорилисати бројним серин-киназама (108).

NO је неизоставни медијатор многобројних процеса у кардиоваскуларном, нервном и имунском систему. Његова фундаментална функција у КВС је вазодилатација, посредством које је овај гасотрансмитер укључен у регулисање екстрацелуларног волумена течности, крвног притиска и ерекције (109).

Вазодилатација настаје стварањем NO од стране eNOS у ендотелу крвног суда, под утицајем ацетил-холина, цитокина и shear stress-а. NO затим дифундије у глатке васкуларне мишићне ћелије, где у реакцији са солубилном гуанилил-циклазом (sGC), ствара cGMP-а. Солубилни cGMP потом активира протеин киназу G (PKG), која изазива фосфорилизацију протеина укључених у регулацију Ca^{2+}, активност јонских канала и актинских и миозинских филамената, сумарно доводи до релаксације глатког мишића ендотела (109).

Поред тога NO учествује у редокс сигнализацији између нервних ћелија централног и периферног нервнос система. Будући да је у гасовитом стању и да дифундује кроз мембране, NO може да преноси информацију и на неуроне који нису у синаптичким везама. Ипак с обзиром да му је време полу-живота кратко, његова активност је временски ограничена. NO-cGMP сигнални пут је укључен у процесе

учења и памћења стимулацијом сигналне трансдукције типа продужене потенцијације (110).

NO-а је значајан не-адренергички и не-холинергички неуротрансмитер различитих делова гастроинтестиналног тракта (ГИТ), а његов доминанатни ефекат се огледа у релаксацији глатких мишића ГИТ-а (111).

Директни ефекти NO-а на срце су предмет све чешћих испитивања. Претпоставља се да NO редукује контрактилну моћ миокарда и фреквенцу и да има значајно место у патогенези коронарне артеријске болести(112).

Показано је да NO може да утиче и на ћелијксе процесе укључен у стварање енергије, молекуласком компетицијом са O_2^- за цитохром C оксидазу (113).

Поред тога је NO изузетно реактиван према једињењима која садрже слободну SH групу. Наиме, показано је да NO може да изврши нитрозилацију бројних SH протеина (114). Нитрозилацијом аргиназа, NO повећава афинитет овог ензима за аргинин више пута, чиме доприноси повећаној разградњи ове аминоксиселине чиме смањује своју биорасположивост (115). Интересантно је да је повећана активност аргиназе пронађена код старих пацова са ендотелном дисфункцијом (115), што потврђује значај овог процеса.

NO такође може директно да утиче на биосинтезу D-серина, који је ко-агонист глутамату за NMDA рецепторе (116). Нитрозилацијом серин рацемазе NO смањује активност.

Нитрозилација рианодинских рецептора (RyR), мења динамику Ca^{2+} поготово током систоле срчаног циклуса, што изазива поремећај ћелијске надражљивости и доводи до појаве аритмија (117).

Нитрозилација микротубул-везаног протеина-1B (MAP1B) се среће у неуролошким поремећајима, као што је `фрагилни X синдром` (118). Осим тога, активацијом iNOS долази до синтезе NO који нитолизацијом гликолитичког GAPDH ензима, индукује апоптозу (119). Нитолизација металопротеиназа изазива програмирану ћелијску смрт неурона, која се среће код исхемије мозга (120). Такође, посредством нитрозилације COX-2 ензима, NO узима учешће у запаљенским процесима (121). Наиме, током запаљења, азот моноксид кога производи iNOS, повећава активност ових ензима, чиме стимулише производњу простагландина и тиме имунску реакцију (121).

1.7.3. Специфичне карактеристике угљен моноксида (CO)

CO је дуго година био повезиван само са негативним дејствима на људски организам првенствено због добро познатих штетних дејстава његовог егозгеног уноса. Ипак, спознајом да овај гас може да буде ендогено синтетисан у малим концентрацијама и да остварује неуротрансмитерску функцију настаје прави заокрет у медицинској доктрини (122). Истраживања у последњих двадесетак година су показала да CO представља све важнији сигнални молекул са бројним функцијама које се још увек истражују и које су јако блиске NO-у (123).

CO се у организму ствара из хема током процеса разградње хемоглобина, под утицајем ензима хем-оксигеназе 1 и 2 (HO 1, 2). HO могу поседују индуцибилну (HO 1) и конститутивну форму (HO 2). HO 1 разграђује хем до биливердина, продукујући на тај начин CO. Доказано је да HO 1 продукцијом CO испољава антиинфламаторно дејство путем блокирања синтезе про-инфламаторних, и стимулацијом производње анти-инфламаторних цитокина (124).

CO има вазодилататорна својства а може имати и друга корисна дејства у кардиоваскуларном систему (125). Инхибицијом пролиферације глатких мишића, спречава формирање атеросклеротских плакова (125). Осим тога, CO побољшава ендотелну дисфункцију, путем смањења вазоконстрикције и контролом активности индуцибилног фактора хипоксије 1α (HIF 1α) (126).

Са друге стране, конститутивни HO 2 активира калцијум-калмодулин систем (127, 128). Поред сличности, CO има и бројне функције које су супротне од NO-а. У том смислу, HO 2 је смештен у ендотелу крвних судова, и синтетише CO који индукује вазодилатацију. Међутим, механизми ове вазодилатације још увек нису довољно испитани (129). HO 2 се такође налази у многим неуронским мрежама (130) и у мијентеричном плексусу ГИТ-а, где учествује у нон-адренергичкој и нон-холинергичкој сигнализацији (131).

Сигнални путеви CO-а су недовољно познати. Сматра се да CO делује преко гуанилил-циклазе (sGC), узрокује стварање cGMP-а и последичну релаксацију глатких мишића (132, 133). Други начин остваривања ефеката CO-а подразумева његово везивање за хем групу путем кога овај гас може да утиче на процес транскрипције (134).

pAS протеин 2 (NPAS2) пронађени у неуронима представљају важан транскрипциони фактор. Истраживања су сугерисала да CO, везивањем за хем групу NPAS2, може да спречи везивање ДНК за NPAS2 и тиме онемогући процес транскрипције (135).

1.7.4. Специфичне карактеристике водоник сулфида (H_2S)

Слично као и у случају CO, сви ефекти водоник сулфида на људски оргназим су посматрани кроз призму његових штетних егзогених дејстава, док се ендогеним ефектима овог гаса веома мало знало. Негативна дејства H_2S су пре свега повезивана са централним нервним системом. Молекулски механизма путем кога H_2S остварује своје ефекте подразумева инихбицију ћелијског дисања (136).

У новије време је међутим откривено да се H_2S може синтетисати и у организму транс-сулфурацијом амино киселина L-цистеина и/или хомоцистеина, дејством три ензима: цистатион-γ-лиазе (CSE), цистатион-β-синтазе (CBT) и 3-меркаптопируват сулфуртрансферазе (3MST) (137). Повезаност хомоцистеина и H_2S током продукције овог гаса је била једна од линија водиља овог истраживања са циљем прецизнијег објашњења њихове комплексне интеракције.

CSE је мајоритетно активан у аорти, плућној артерији и мезентеричној артерији (138), док CBT своју активност остварује у неуронима (139). У јетри и бубрезима, оба ензима синергистички суделују делују у производњи овог гаса (140).

Трансмитерска дејства H_2S-а могу да буду веома блиска CO-у и NO-у. У том смисли, већина студија је показала да овај гас остварује изразито вазодилататорно дејство, а потврда тога је и постојање CSE у ендотелу крвних судова (141). Ипак, има и података да H_2S може довести до констрикције васкуларних глатких мишића (141). Због тога се претпоставља да дејство H_2S-а на вазомоцију зависе од његове концентрације, на коју може значајно да утиче процес оксидације овог гаса (141).

Механизам вазодилататорног дејства H_2S-а није са сигурношћу познат. Иако се у први мах сматрало да активира осовину sGC-cGMP (142), данас је доминантна хипотеза да H_2S изазива релаксацију васкуларних глатких мишића стимулацијом ATP-зависних калијумових канала (143). Поред тога, многе ефекте H_2S остварује путем сулфхидрације која изазива активацију протеина (144).

II

ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

1. Повишене вредности хомоцистеина и хомоцистеин тиолактона повећавају липидну пероксидацију (MDA) и/или узорукују смањену активност антиоксидационих ензима заштите (SOD, CAT и GPx) и тиме изазивају системску појаву оксидационог стреса у плазми пацова.

2. Акутна и субхронична хиперхомоцистеинемија могу утицати на активност ензима ацетилхолинестеразе AchE у срчаном мишићу пацова, самостално и/или у садејству са различитим гасотрансмитерима од којих су најзначајнији NO, H_2S и CO.

2.2. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

2.2.1. Генерални циљ

Евалуација ефеката акутне (индуковане DL-хомоцистеином и DL-хомоцистеин тиолактоном) и субхроничне хиперхомоцистеинемије (индуковане DL-хомоцистеином) на концентрацију прооксидативних и активност антиоксидативних маркера у плазми пацова, као и на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву миокарда пацова.

2.2.2. Специфични циљеви

1. Испитати утицај акутне и субхроничне хиперхомоцистеинемије на редокс равнотежу пацова преко одређивања различитих параметара оксидативног стреса: малонилдиалдехида (MDA), каталазе (CAT), супероксид дизмутазе (SOD) и глутатион пероксидазе (GPx).
2. Испитати ефекат инхибиције синтезе гасних молекула (NO, H_2S и CO) на параметре оксидационог стреса у плазми и активност ацетилхолинестеразе у срцу пацова у току акутне хиперхомоцистеинемије.
3. Испитати утицај субхроничне хиперхомоцистеинемије на концентрацију прооксидативних и активност антиоксидативних маркера у плазми пацова, као и на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву миокарда пацова.

III

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. МАТЕРИЈАЛ

За припрему пуфера и перфузионих раствора коришћени су комерцијални реагенси pro analysis квалитета произвођача Sigma–Aldrich Chemie GmbH, (Немачка).

У истраживању су употребљени комерцијални реагенси pro analysis квалитета поменутог произвођача - Sigma–Aldrich Chemie GmbH, (Немачка):

а) DL-хомоцистеин (DL Hcy), Mr 135.18;

б) DL-хомоцистеин тиолактон хидрохлорид (DL Hcy tlhc), Mr 153.63;

в) N(ω)-нитро-L-аргинин метил естар (L-NAME), неселективни инхибитор NOS, Mr 269.69;

г) цинкпротопорфирин IX ((Zn)PPR IX), селективни инхибитор HO 1, Mr 626.03;

д) DL-пропаргилглицин (DL PAG), селективни инхибитор CSE, Mr 113.11.

Поред оба облика хомоцистеина употреба осталих супстанци је имала следећу намену:

а) L-NAME - неселективни инхибитор NOS, за инхибицију синтезе азот моноксида (NO)

б) ZnPPR IX - селективни инхибитор хемоксигеназе 1 (HO 1), за инхибицију синтезе угљен моноксида (CO)

в) DL PAG - селективни инхибитор цистатион γ лиазе CSE, за инхибицију синтезе водоник сулфида (H_2S)

За аналитичко одређивање параметара оксидационог статуса, коришћени су комерцијални реагенси pro analysis квалитета произвођача Sigma–Aldrich Chemie GmbH, (Немачка).

3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОТОКОЛ

Студија припада експерименталним истраживањима *in vitro.*

Истраживање је спроведено у лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Института за медицинску физиологију `Рихард Буриан` Медицинског Факултета у Београду.

Истраживање је обухватило 140 пацова, Вистар албино соја, мушког пола, старости 10 недеља и телесне масе 250±30г. Животиње су се чувале у строго контролисаним условима (температура ваздуха 22±1 °C, релативна влажност ваздуха 50%, циклус светлост:тама 12:12 часова, са почетком светлог периода у 9 часова), и са

слободним приступом води и стандардној храни. Све експерименталне процедуре су спроведене у складу са прописаним актима (EU Directive for the Protection of the Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EEC) и принципима етичности.

Експериментални протокол је одобрен од стране Етичког одбора за добробит експерименталних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Истраживање је било подељено у једанаест (11) група (10 животиња у групи):

Акутна серија експеримената (акутна хиперхомоцистеинемија):

1) контролна група - апликација физиолошког раствора (1 ml 0.9% NaCl, pH 7.4, i.p.),

2) експериментална група - апликација DL-хомоцистеина (8 mmol/kg тм, i.p.),

3) експериментална група - апликација DL -хомоцистеин тиолактона (8 mmol/kg тм, i.p.),

4) експериментална група - апликација L-NAME (10 mg/kg тм, i.p.),

5) експериментална група - апликација цинкпротопорфирина IX (30 μmol/kg тм, i.p.),

6) експериментална група – апликација DL-пропаргилглицина (50 mg//kg тм, i.p.),

7) експериментална група – коапликација DL-хомоцистеина (8 mmol/kg тм, i.p.) и L-NAME (10 mg/kg тм, i.p.),

8) експериментална група – коапликација DL-хомоцистеина (8 mmol/kg тм, i.p.) и цинкпротопорфирина IX (30 μmol/kg тм, i.p.),

9) експериментална група – коапликација DL-хомоцистеина (8 mmol/kg тм, i.p.) и DL-пропаргилглицина (50 mg//kg тм, i.p.),

Субхронична серија експеримената (субхронична хиперхомоцистеинемија):

10) експериментална група – апликација физиолошког раствора (0.45 μmol/g тм. s.c., два пута дневно у интервалу од 8 сати, у периоду од четрнаест дана)

11) експериментална група – апликација DL-хомоцистеина (0.45 μmol/g тм. s.c., два пута дневно у интервалу од 8 сати, у периоду од четрнаест дана)

У циљу изазивања акутне хиперхомоцистеинемије поменутим експерименталним групама је интраперитонеално администрирана једна доза DL-хомоцистеина (8 mmol/kg тм) и DL-хомоцистеин тиолактона (8 mmol/kg тм). Шездесет

(60) минута након апликације, животиње су жртвоване ради прикупљања узорака крви (за мерење маркера оксидационог стреса) и узимања ткива срца у чијем хомогенату је одређивана активност ацетилхолинестеразе (AchE).

Субхронична хиперхомоцистеинемија је изазвана апликацијом DL-хомоцистеина (0.45 μmol/g тм. s.c., два пута дневно у интервалу од 8 сати, у периоду од четрнаест дана) (145).

3.3. БИОХЕМИЈСКЕ АНАЛИЗЕ

Узорци крви пацова, ради анализе биохемијских параметара су сакупљани у у вакумске епрувете са цитратом, а основна обрада узорака се састојала се од одвајања еритроцита од плазме центрифугирањем (10 min на 5000 rpm, 4°C). Исталожени еритроцити су ресуспендовани и три пута испрани физиолошким раствором уз центрифугирање 10 min на 5000 rpm, а затим замрзнути на -20°C до анализе.

У прикупљеним узорцима крви спектрофотометријским методама су одређивани:

1. специфична активност ацетилхолинестеразе (AchE)
2. параметри оксидационог стреса:
   а) ниво малонилдиалдехида (MDA) као индикатора липидне пероксидације,
   б) активност каталазе (CAT),
   в) активност супероксид дизмутазе (SOD)
   г) активност глутатион пероксидазе (GPx).

Мерење је спроведено на спектрофотометру Analytic Jena Specord S 600. Наведени параметри оксидационог стреса су се одређивали у контролним условима, затим у акутној серији експеримената, и након субхроничне апликације DL-хомоцистеина. У циљу потврде постојања хиперхомоцистеинемије, у групи која је подвргнута субхроничној апликацији DL-хомоцистеина се поред поменутих маркера мерила и концетрација укупног хомоцистеина у плазми HPLC (*engl. high-performance liquid chromatography*) методом (146).

3.3.1. Одређивање активности ацетилхолинестеразе (AchE)

Специфична активност ацетилхолинестеразе (AchE) у ткивном хомогенату срца је одређивана *in vitro* методом по Ellman-у (147). Метода се заснива на реакцији бојеног реагенса (5,5-дитио-бис-2-нитробензоева киселина, DTNB) са производом хидролизе тиохолинског супстрата, ацетилхолин-јодида (AchI), тиохолином, при чему настаје једињење 5-тио-2-нитро-бензоат-жуте боје, чији је интезитет сразмеран специфичној активности AchE. Одговарајућа заперимина хомогената испитиваног ткива се разблажује адекватном запремином фосфатнг пуфера pH=8 (40 µl хомогената ткива срца у 580 µl фосфатног пуфера) и преинкубирана на температури 37 °C, 10 минута. Након преинкубације се додаје 20 µl бојеног реагенса DTNB и 10 µl супстрата AchE, сукцесивно, и припремљена смеса се инкубира на температури 37 °C, 5 минута. Ензимска реакција се зауставља додавањем 50 µl натријум-додецил-сулфата (SDS). Промена апсорбанце се мери колориметријски на 420 nm таласне дужине. Активност AchE се изражава као ΔA/мин x mg протеина.

3.3.2. Одређивање концентрације продуката липидне пероксидације (MDA)

Један од продуката липидне пероксидације малонилдиалдехид (MDA) је одређиван у реакцији са тиобарбиутартном киселином (TBA) (148). Најпре се 500 ml 25% HCl и 500 ml 1% тиобарбиутартне киселине (у 50 mM NaOH) дода у 500 ml узорка плазме. Настала смеша се потом загрева 10 минута у воденом купатилу и затим оставља на собној температури. Потом се дода 3 ml n-butanol-a, меша 30 секунди и центрифугира (10 минута на 2000 × g). Садржај малонилдиалдехида се одређује спектрофотометријски мерењем абсорбанце горњег слоја узорка који се одвојио на на таласној дужини од 532 nm. Слепа проба садржи 50 mM NaOH уместо тиобарбитуратне киселине и припрема се за сваки узорак појединачно. Вредност MDA се изражава у nmol по MDA/ml плазме.

3.3.3. Одређивање активности каталазе (CAT)

Активност каталазе се заснива на методи по Beutler-у која се базира на деградацији H_2O_2 (149). У 50 µl плазме се дода у 2.975 ml 50 mM фосфатног пуфера (у 0.4 mM EDTA). Ензимска реакција се иницира додавањем 30 µl H_2O_2. Смањење

абсорбанце услед разградње H_2O_2 се бележи на таласној дужини од 240 nm. Активност каталазе се изражава у U/ml плазме. Једна јединица ензимске активности (U) се дефинише као 1 µl потрошеног H_2O_2 у једном минуту.

3.3.4. Одређивање активности супероксид дизмутазе (SOD)

Активност укупне супероксид дисмутазе (SOD) је мерена према методи Misre Fridovic-а (150). 10-30 µl плазме се дода у 3 ml 0.5 M EDTA-натријум карбонатног пуфера (pH 10.2). Ензимска реакција започиње додавањем 100 ml адреналина (30 mM у 0.1 M HCl). Активност супероксид дисмутазе је мерена на абсорбанци таласне дужине од 480 nm. Једна јединица ензимске активности (U) се дефинише као количина ензима која инхибира проценат оксидације адреналина за 50%. Активност супероксид дисмутазе се изражава у U/ml плазме.

3.3.5. Одређивање активности глутатион пероксидазе (GPx)

Процедура мерења активности глутатион пероксидазе започиње припремањем реакционе смеше која садржи 8.9 ml фосфатног пуфера, 50 µl 200 mM редукованог глутатиона (GSH), 1 mg β-NADPH и100 ml 100 units/ml глутатион редукатазе из пекарског квасца (*Saccharomyces cerevisiae*). pH реакционе смеше је подешена на 7 додавањем 50 mM NaH_2PO_4 и 0.40 mM EDTA. Потом се помеша 3 ml реакционог коктела и 0.3 ml плазме и дода 50 ml 0.042% H_2O_2 како би се започело са ензимском реакцијом. Снижење абсорбанце (λ = 340 nm) у интервалима од 5 секунди се бележи током 4-5 минута. Активност GPx се изражава као ΔA/min/ml плазме (151).

Све биохемијске анализе су спроведене у лабораторији за кардиоваскуларну физиологију Института за медицинску физиологију `Рихард Буриан` Медицинског Факултета у Београду. Мерење је вршено на спектрофотометру Analytic Jena Specord S 600.

Прорачун укупног узорка је заснован на резултатима претходно публиковане студије da Cunha-е и сарадника (152) у којој је праћен утицај акутне хиперхомоцистеинемије на параметре коагулационог система и маркере оксидационог стреса пацова. За прорачун је коришћен т-тест за везани узорак, двоструко, уз претпоставку алфа грешке од 0.05 и снаге студије 0.8 (бета грешка 0.2) и уз коришћење одговарајућег рачунарског програма (153).

Узимањем у обзир резултата ове студије, укупан број експерименталних животиња је прорачунат на 110 (по 10 у свакој групи). Имајући у виду могућност искључења неких експерименталних животиња из завршне анализе (комплијанса – некомплетни подаци), укупни студијски узорак је утврђен на најмање 140 експерименталних животиња (по 10 у свакој групи).

3.4. Статистичка обрада података

Статистичка обрада података је извршена у статистичком пакету *SPSS 18.0 for Windows.* За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, коришћени су: фреквенција, проценти, узорачка средња вредност, узорачка медијана, узорачка стандардна девијација, ранг и 95% интервали поверења. За испитивање нормалности расподеле коришћени су тестови *Kolmogorov Smirnov* и *Shapiro Wilk,* и графици: хистограм и *normal QQ plot.* За тестирање разлика између параметара, у зависности од њихове природе, коришћени су Студентов т-тест, *Mann-Whitney* тест, Фишеров тест апсолутне вероватноће, једнофакторска или двофакторска анализа варијансе.

IV РЕЗУЛТАТИ

4.1. АКУТНА СЕРИЈА ЕКСПЕРИМЕНАТА

4.1.1. Акутни ефекти DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву миокарда срца пацова и параметре оксидационог стреса у плазми

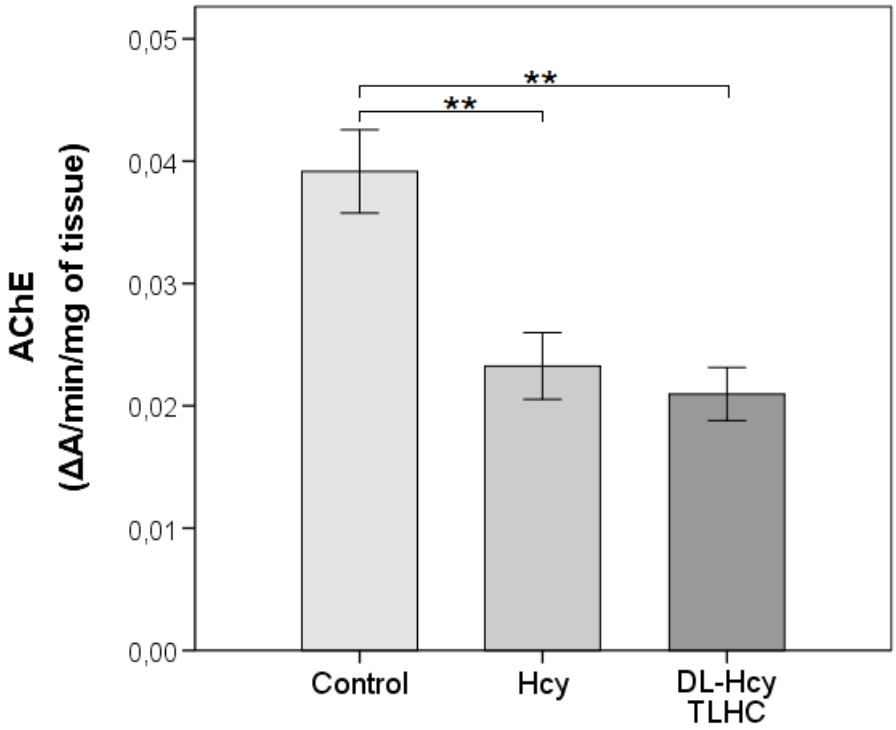
Табела 1. Регистроване вредности ацетилхолинестеразе (AChE) у ткиву миокарда пацова и параметара оксидационог стреса у плазми након акутне апликације DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона (X±SD; X – средња вредност, SD – стандардна девијација)

X±SD	**AChE** (ΔA/min/mg ткива)	**MDA** (nmol/ml плазме)	**CAT** (U)	**CAT** (U/ml плазме)	**GPx** (U/ml плазме)	**SOD** (U/ml плазме)
Контрола	0.039±0.003	15.37±1.41	0.82±0.10	16.40±2.11	1.09±0.14	25.31±0.96
Hcy	0.023±0.002	6.09±0.85	1.32±0.21	26.49±4.22	1.76±0.28	30.41±0.71
DL-Hcy TLHC	0.021±0.002	8.86±1.84	2.57±0.33	51.51±6.79	3.26±0.31	21.35±1.98

Табела 2. Резултати статистичке значајности приликом поређења између група (*p<0,05; **p<0,01)

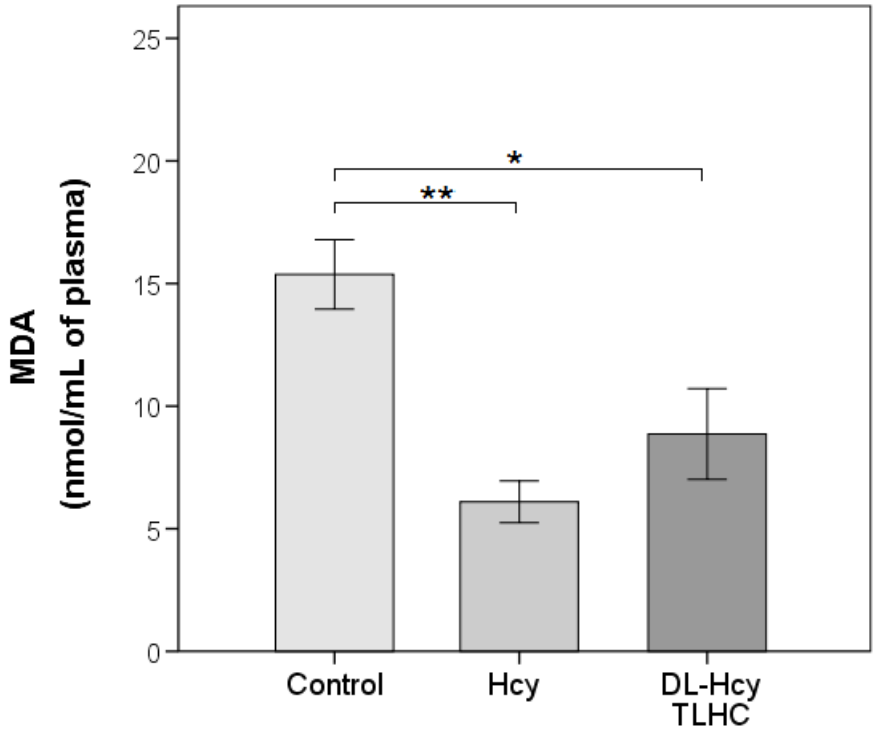
Независни Т-тест	**AChE**	**MDA**	**CAT**	**CAT** у плазми	**GPx**	**SOD**
Контрола / Hcy	**	**	p>0,05	p>0,05	p>0,05	**
Контрола / DL-Hcy TLHC	**	*	**	**	**	p>0,05
Hcy / DL-Hcy TLHC	p>0,05	p>0,05	*	*	**	**

Графикон 1. Ефекти DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона на активност ацетилхолинестеразе (AChE) у ткиву миокарда пацова



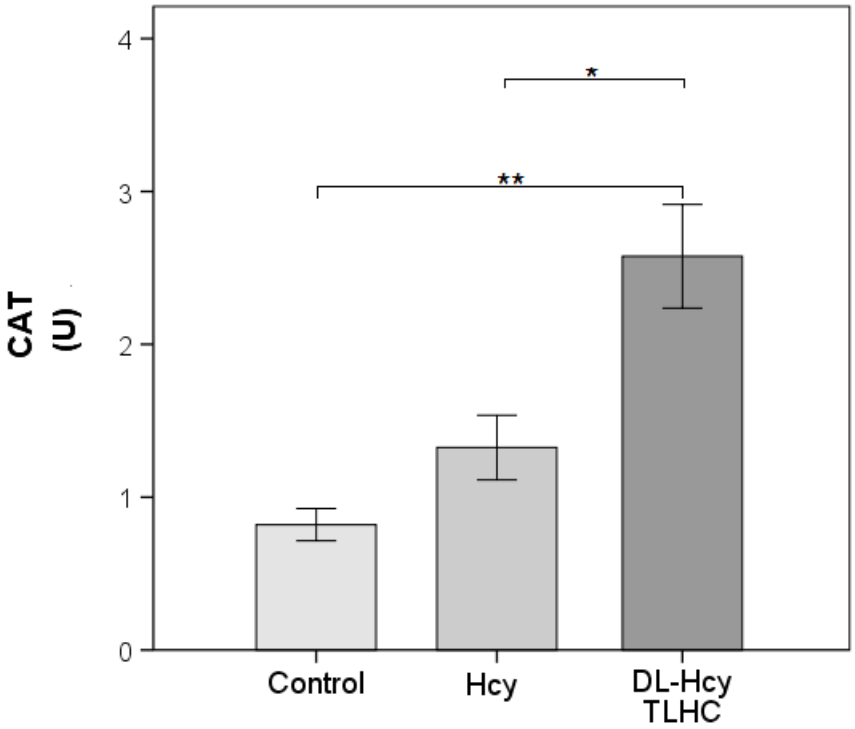
Након апликације DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона дошло је до статистички значајног снижења активности AChE у ткиву срца третираних пацова у односу на контролну групу.

Графикон 2. Ефекти DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона на вредности малонилдиалдехида (MDA) као реагујуће супстанце тиобарбитурне киселине (TBARS) у плазми пацова



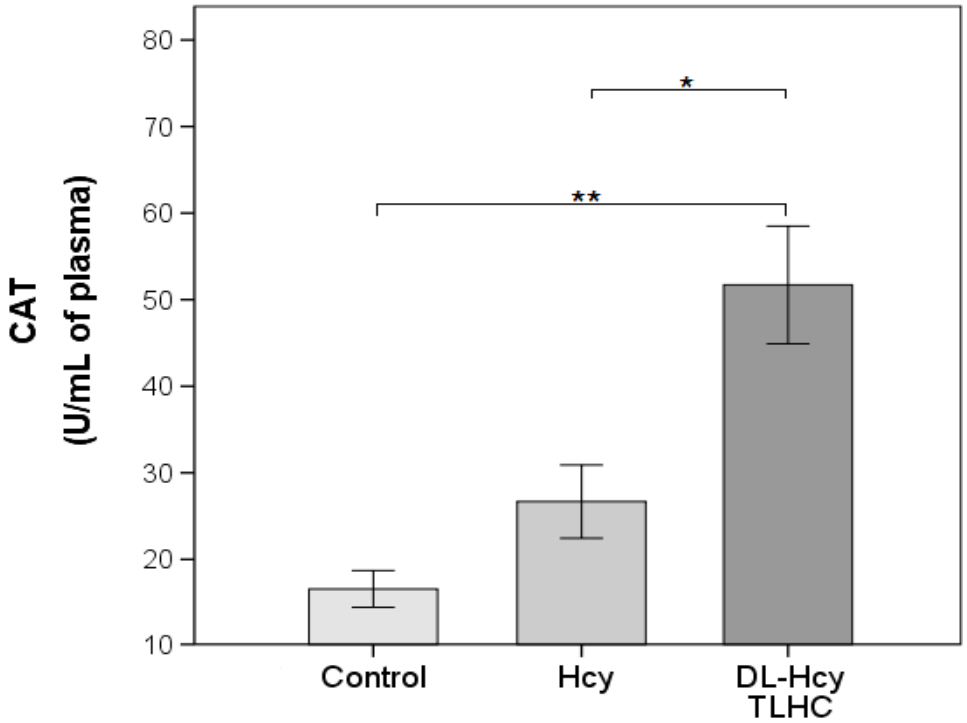
Након апликације DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона дошло је до статистички значајног снижења вредности MDA у плазми третираних пацова у односу на контролну групу.

Графикон 3. Ефекти DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона на вредности каталазе у урину (CAT/U) пацова



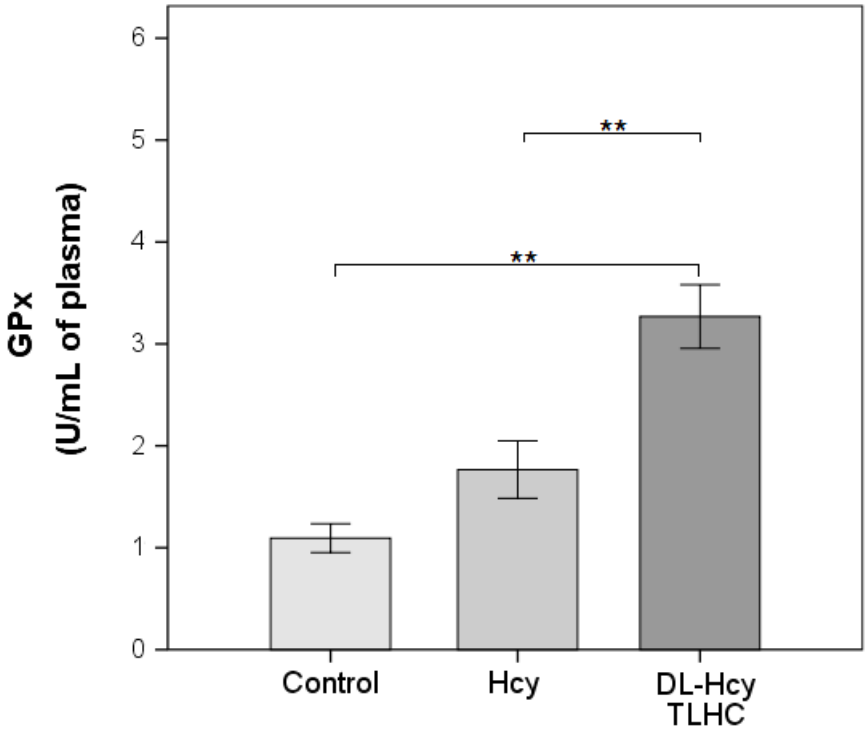
Активност каталазе у урину (CAT/U) статистички значајно је повећана у групи пацова третираних DL-хомоцистеин тиолактоном у односу на контролну групу, као и у односу на групу пацова третираних DL-хомоцистеином.

Графикон 4. Ефекти DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона на вредности каталазе у плазми (CAT/плазми) пацова



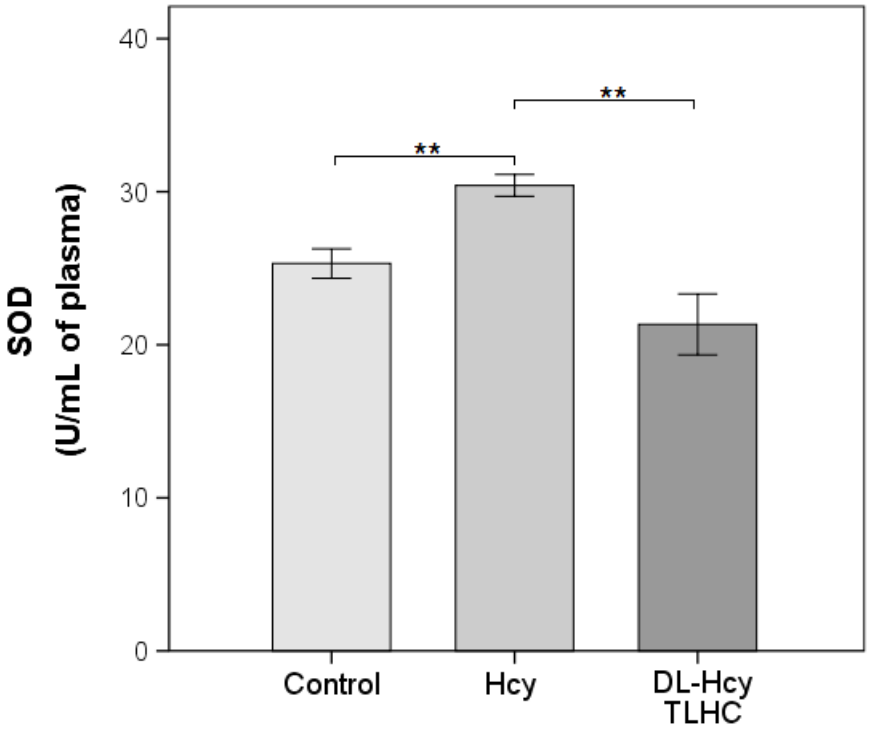
Активност каталазе у плазми (CAT/плазма) статистички значајно је повећана у групи пацова третираних DL-хомоцистеин тиолактоном у односу на контролну групу, као и у односу на групу пацова третираних DL-хомоцистеином.

Графикон 5. Ефекти DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона на вредности глутатион пероксидазе (GPx) у плазми пацова



Активност глутатион пероксидазе (GPx) у плазми статистички значајно је повећана у групи пацова третираних DL-хомоцистеин тиолактоном у односу на контролну групу, као и у односу на групу пацова третираних DL-хомоцистеином.

Графикон 6. Ефекти DL-хомоцистеина и DL-хомоцистеин тиолактона на вредности супероксид дисмутазе (SOD) у плазми пацова



Активност SOD у плазми статистички значајно је повећана у групи пацова третираних DL-хомоцистеином у односу на друге две групе пацова (контролну и групу пацова третираних DL-хомоцистеин тиолактоном).

4.1.2. Акутни ефекти инхибитора синтезе гасотрансмитера (L-NAME, PPR IX и DL-PAG) на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву миокарда срца пацова и параметре оксидационог стреса у плазми

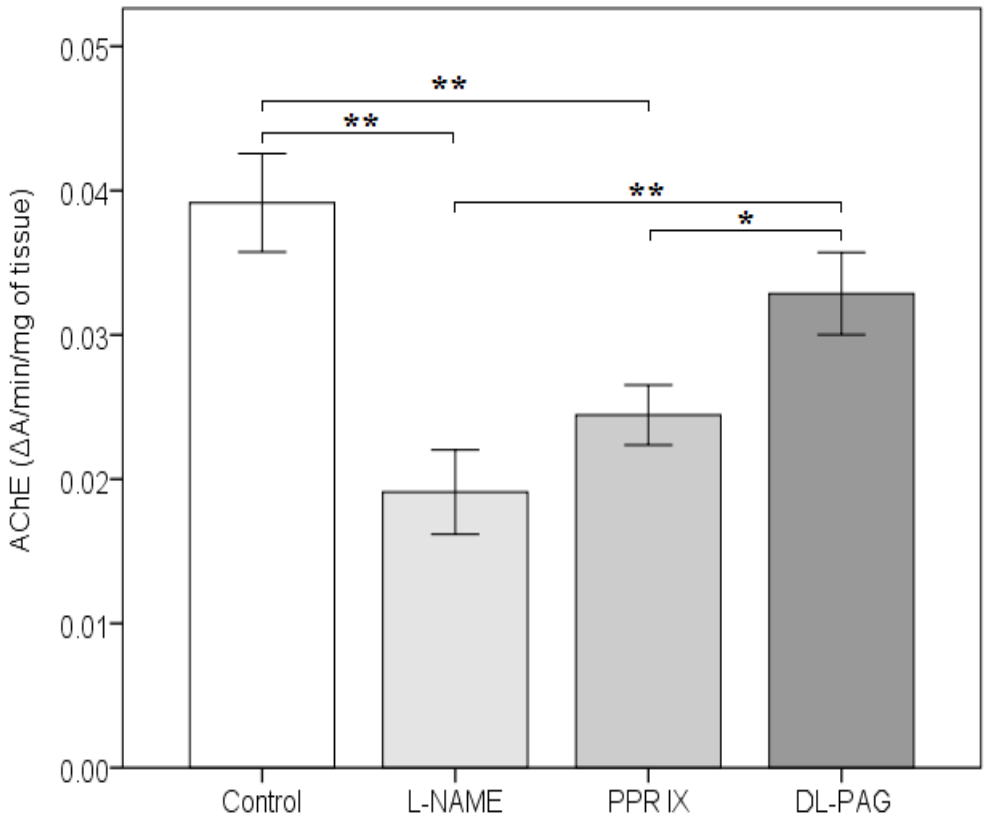
Табела 3. Регистроване вредности ацетилхолинестеразе (AChE) у ткиву миокарда пацова и параметара оксидационог стреса у плазми након акутне апликације инхибитора синтезе гасотрансмитера (L-NAME, PPR IX и DL-PAG) (X±SD; X – средња вредност, SD – стандардна девијација)

X±SD	**AChE** (ΔA/min/mg ткива)	**MDA** (nmol/ml плазме)	**CAT** (U)	**CAT** (U/ml плазме)	**GPx** (U/ml плазме)	**SOD** (U/ml плазме)
Контрола	0.039±0.003	15.37±1.41	0.82±0.10	16.40±2.11	1.09±0.14	25.31±0.96
L-NAME	0.019±0.002	5.63±0.85	2.58±0.17	50.59±3.58	3.37±0.23	31.07±0.40
PPR IX	0.024±0.002	17.30±4.74	3.37±0.10	67.54±2.08	4.50±0.13	26.46±2.65
DL-PAG	0.032±0.002	5.28±1.37	5.93±0.60	118.69±12.13	7.91±0.80	30.25±0.54

Табела 4. Резултати статистичке значајности приликом поређења између група (*p<0,05; **p<0,01)

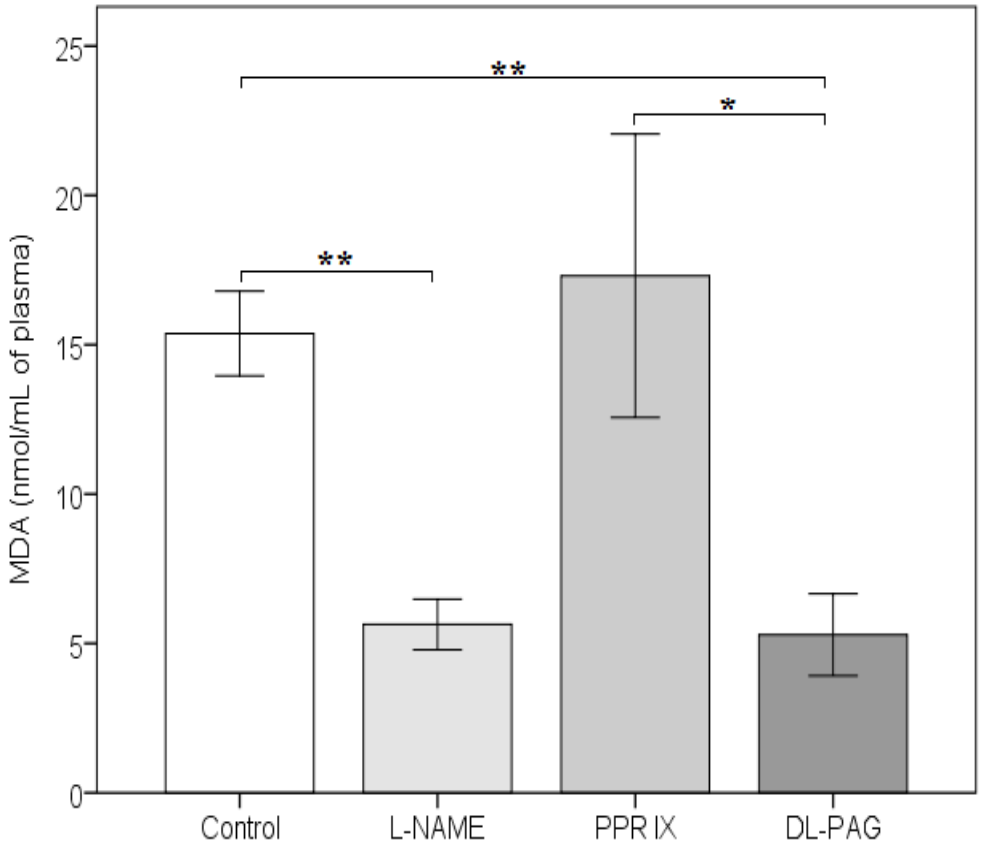
Независни Т-тест	**AChE**	**MDA**	**CAT**	**CAT** у плазми	**GPX**	**SOD**
Контрола / L-NAME	**	**	**	**	**	**
Контрола / PPR IX	**	p>0,05	**	**	**	p>0,05
Контрола / DL-PAG	p>0,05	**	**	**	**	**
L-NAME / PPR IX	p>0,05	p>0,05	**	**	**	p>0,05
L-NAME / DL-PAG	**	p>0,05	**	**	**	p>0,05
PPR IX / DL-PAG	*	*	**	**	**	p>0,05

Графикон 7. Ефекти инхибитора синтезе гасотрансмитера на активност ацетилхолинестеразе (AChE) у ткиву миокарда пацова



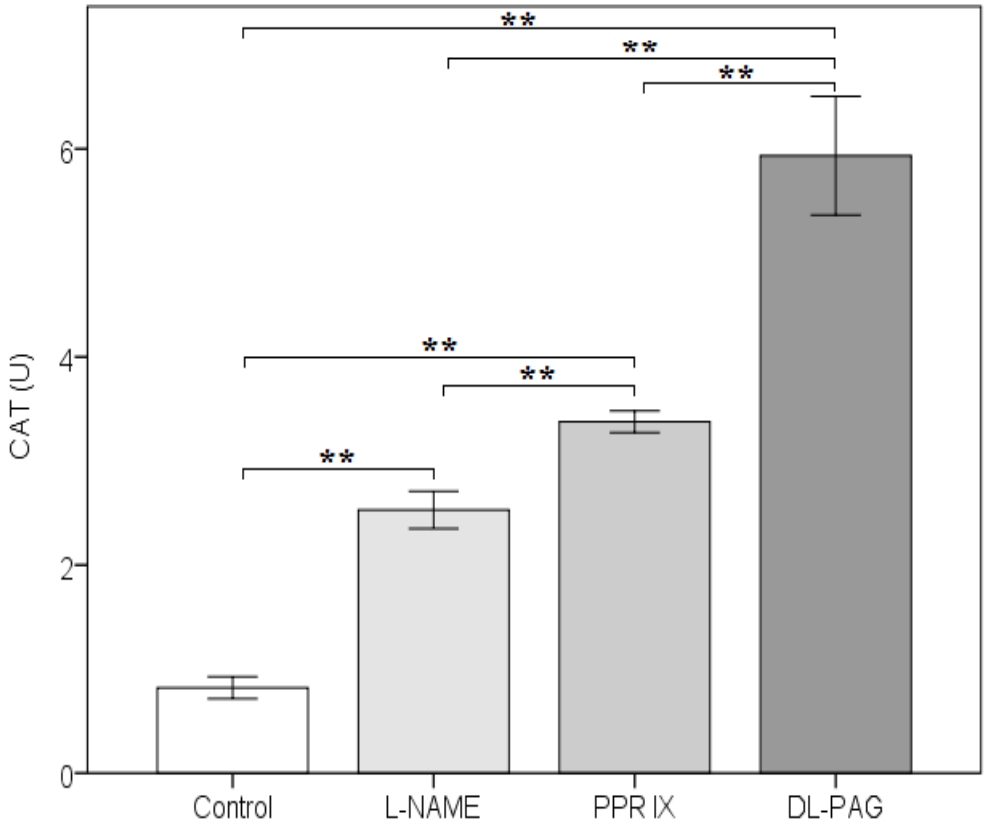
У ткиву миокарда пацова, након апликације L-NAME и PPR IX дошло је до статистички значајног снижења AChE у односу на контролну групу и групу којој је апликован DL-PAG.

Графикон 8. Ефекти инхибитора синтезе гасотрансмитера (L-NAME, PPR IX и DL-PAG) на активност липидне пероксидације (MDA) у плазми пацова



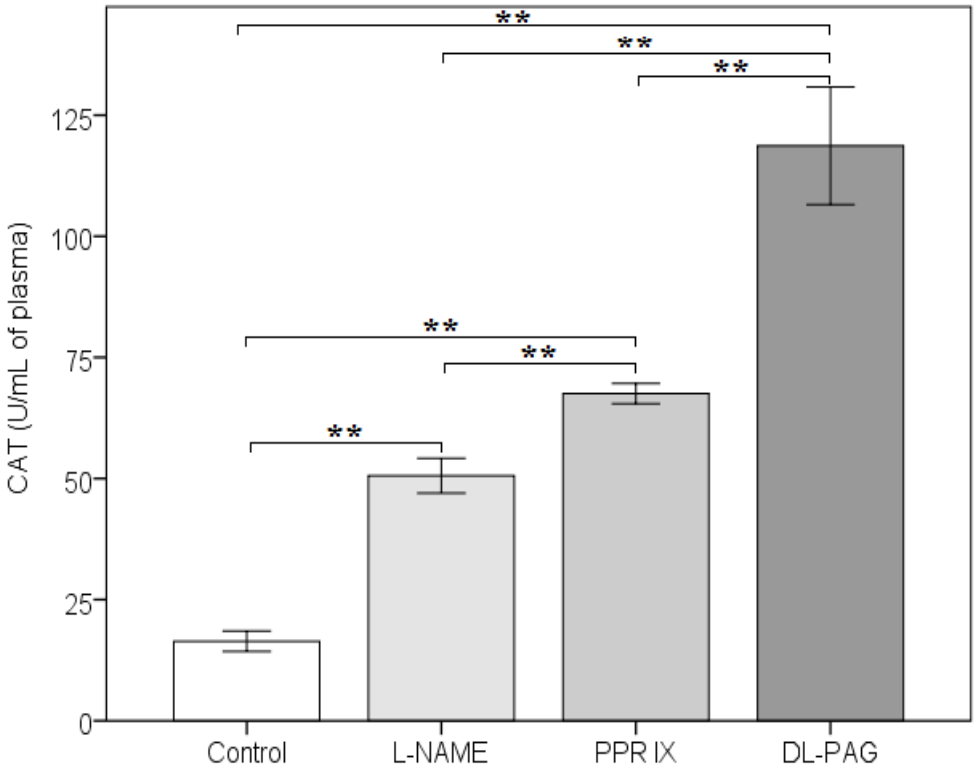
Након апликације L-NAME и DL-PAG дошло је до статистички значајног снижења MDA у плазми у односу на контролну групу и групу пацова третираних PPR IX.

Графикон 9. Ефекти инхибитора синтезе гасотрансмитера (L-NAME, PPR IX и DL-PAG) на активност каталазе у урину (CAT/U) пацова



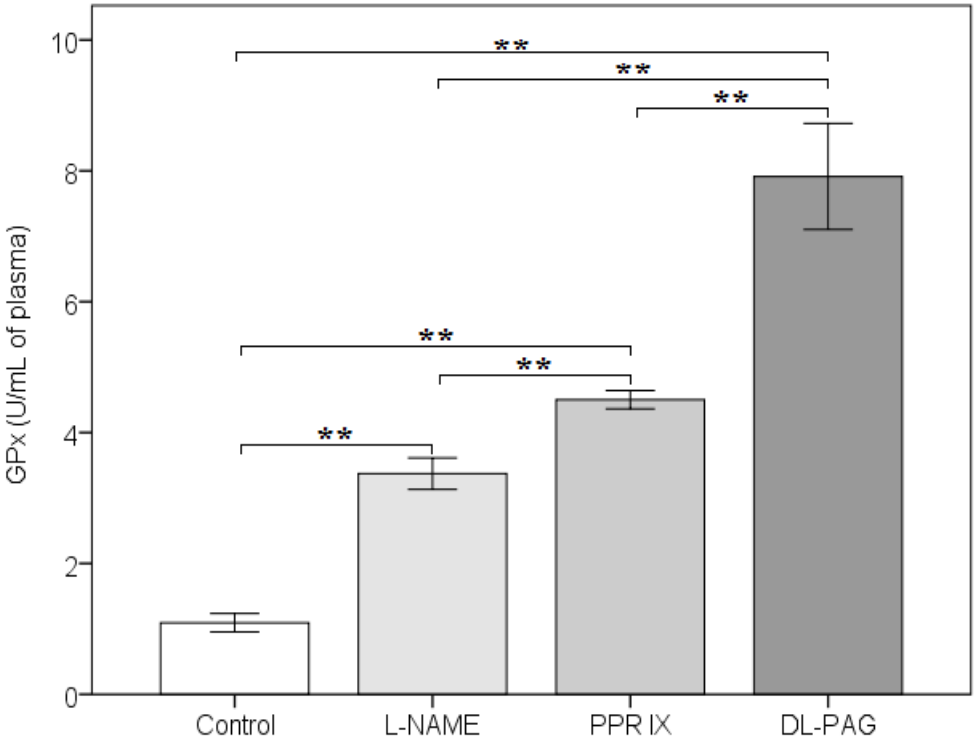
Након апликације свих испитиваних инхибитора синтезе гасотрансмитера дошло је до статистички значајног повећања активности каталазе у урину у односу на контролну групу пацова. Такође, забележене су и статистички значајне разлике у вредностима овог параметра између испитиваних група при чему су највише вредности биле након апликације DL-PAG, а најниже након апликације L-NAME.

Графикон 10. Ефекти инхибитора синтезе гасотрансмитера (L-NAME, PPR IX и DL-PAG) на активност каталазе у плазми (CAT/плазми) пацова



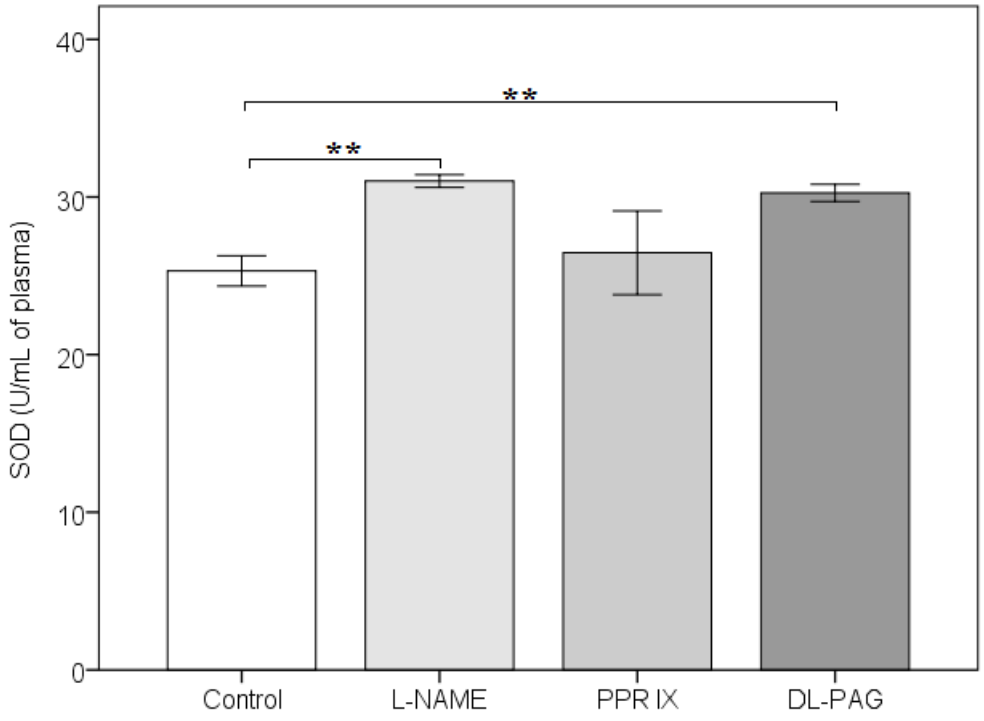
Након апликације свих испитиваних инхибитора синтезе гасотрансмитера дошло је до статистички значајног повећања активности каталазе у плазми у односу на контролну групу пацова. Такође, забележене су и статистички значајне разлике у вредностима овог параметра између испитиваних група, при чему су највише вредности биле након апликације DL-PAG, а најниже након апликације L-NAME.

Графикон 11. Ефекти инхибитора синтезе гасотрансмитера на вредности глутатион пероксидазе (GPx) у плазми пацова



Сви испитивани инхибитори синтезе гастротрансмитера (L-NAME, PPR IX и DL-PAG) довели су до статистички значајног повећања глутатион пероксидазе у односу на контролну групу пацова. Такође, статистички значајне разлике забележене су и приликом поређења испитиваних група, при чему су највише вредности биле након апликације DL-PAG, а најниже након апликације L-NAME.

Графикон 12. Ефекти L-NAME, PPR IX и DL-PAG на вредности супероксид дисмутазе (SOD) у плазми пацова



Након апликације L-NAME и DL-PAG дошло је до статистички значајног повећања вредности SOD у плазми, у односу на контролну групу пацова.

4.1.3. Акутни ефекти комбиноване примене DL-хомоцистеина и инхибитора синтезе гасотрансмитера на активност ензима ацетилхлинестеразе у ткиву миокарда срца пацова и параметре оксидационог стреса у плазми

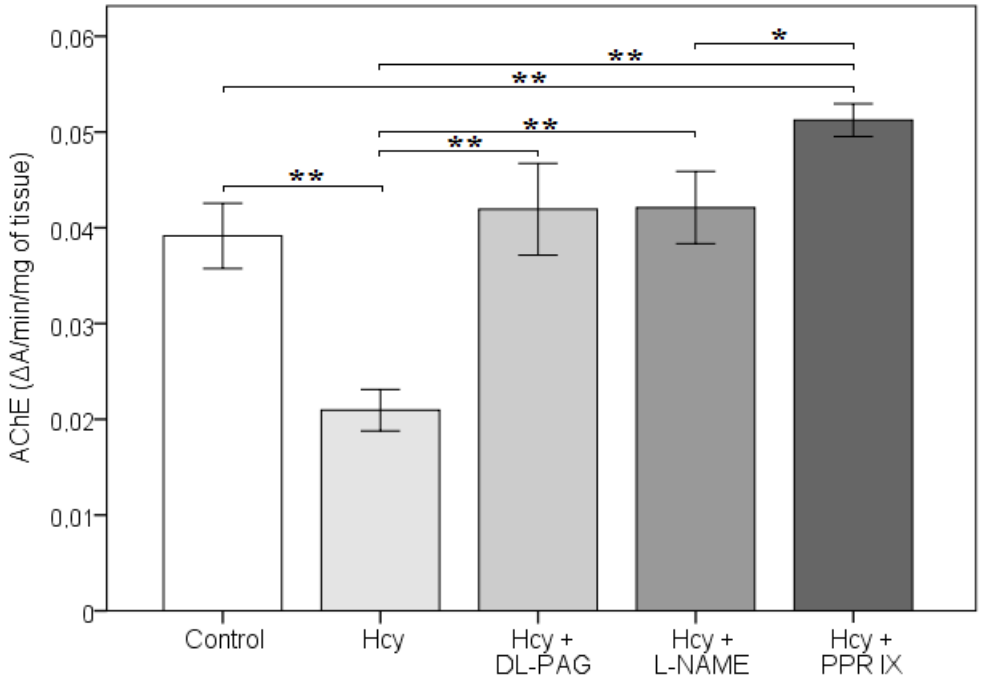
Табела 5. Регистроване вредности ацетилхолинестеразе (AChE) у ткиву миокарда и параметара оксидационог стреса у плазми пацова након комбиноване акутне апликације DL-хомоцистеина и инхибитора синтезе гасотрансмитера (X±SD; X – средња вредност, SD – стандардна девијација)

X±SD	**AChE** (ΔA/min/mg ткива)	**MDA** (nmol/ml плазме)	**CAT** (U)	**CAT** (U/ml плазме)	**GPx** (U/ml плазме)	**SOD** (U/ml плазме)
Контрола	0.039±0.003	15.37±1.41	0.82±0.10	16.40±2.11	1.09±0.14	25.31±0.96
Hcy	0.023±0.002	6.09±0.85	1.32±0.21	26.49±4.22	1.76±0.28	30.41±0.71
Hcy+DL-PAG	0.041±0.004	9.90±0.94	5.47±1.12	109.58±22.43	6.37±0.72	32.66±1.20
Hcy+L-NAME	0.042±0.003	4.10±0.74	6.39±0.95	127.87±19.17	7.60±0.77	32.98±0.94
Hcy+PPR IX	0.051±0.001	4.28±0.59	9.05±0.83	181.19±16.64	12.59±0.69	33.36±0.43

Табела 6. Резултати статистичке значајности приликом поређења између група (*p<0,05; **p<0,01)

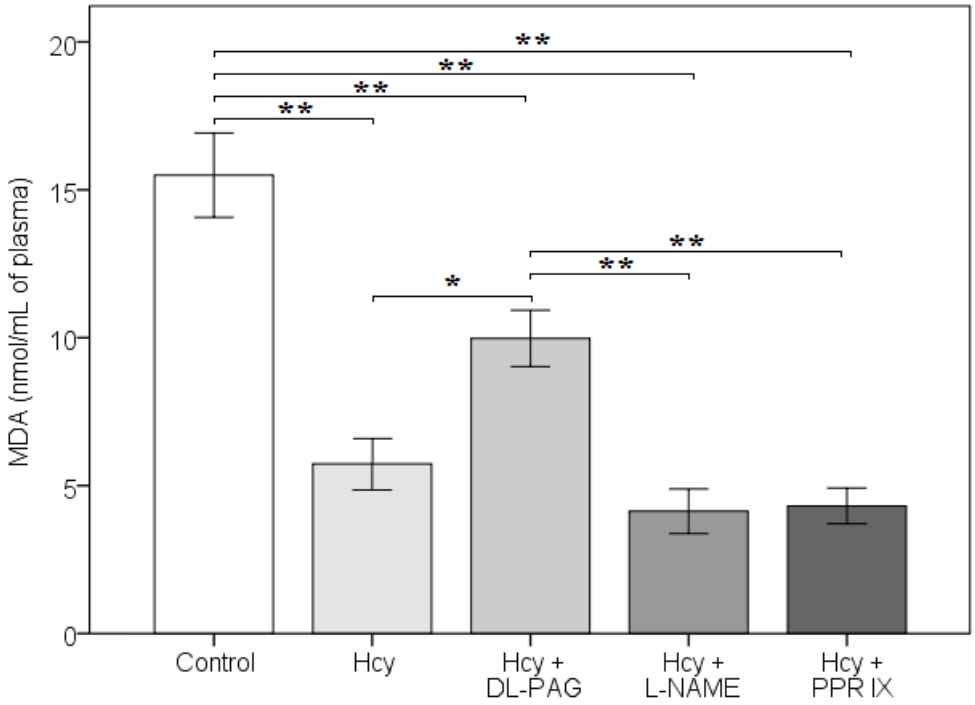
Независни Т-тест	**AChE**	**MDA**	**CAT**	**CAT** у плазми	**GPX**	**SOD**
Контрола / Hcy+DL-PAG	p>0,05	*	**	**	**	**
Контрола / Hcy+L-NAME	p>0,05	**	**	**	**	**
Контрола / Hcy+PPR IX	**	**	**	**	**	**
Hcy / Hcy+DL-PAG	**	*	**	**	**	p>0,05
Hcy / Hcy+L-NAME	**	p>0,05	**	**	**	p>0,05
Hcy / Hcy+PPR IX	**	p>0,05	**	**	**	**
Hcy+DL-PAG / Hcy+L-NAME	p>0,05	**	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Hcy+DL-PAG / Hcy+PPR IX	p>0,05	**	*	*	**	p>0,05
Hcy+L-NAME / Hcy+PPR IX	*	p>0,05	p>0,05	p>0,05	**	p>0,05

Графикон 13. Ефекти комбиноване примене Hcy и DL PAG, Hcy и L-NAME, Hcy и PPR IX на активност ацетилхолинестеразе (AChE) у ткиву миокарда срца пацова



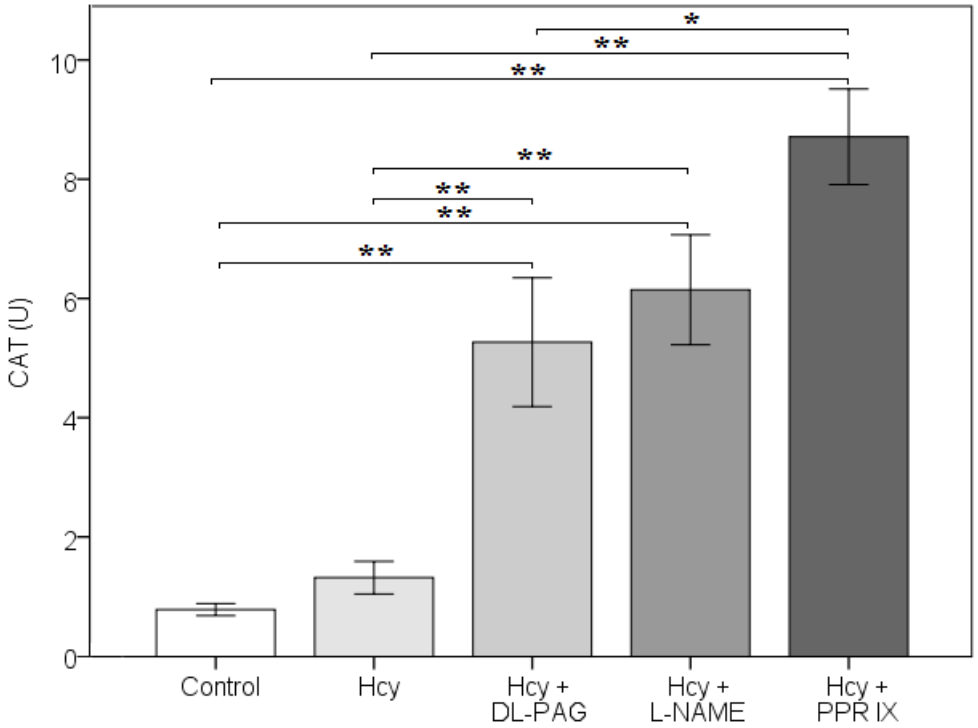
Након комбиноване примене DL-хомоцистеина и инхибитора синтезе гасотрансмитера дошло је до статистички значајног повећања активности AChE у односу на групу пацова којој је апликован само DL-хомоцистеин. Такође, вредности AChE биле су значајно повишене у групи пацова којој је апликована комбинација Hcy+PPR IX у односу на контролну групу, али и у односу на групу којој је апликована комбинација Hcy+L-NAME.

Графикон 14. Ефекти комбиноване примене Hcy и DL PAG, Hcy и L-NAME, Hcy и PPR IX на активност липидне пероксидације (MDA/плазма) у плазми пацова



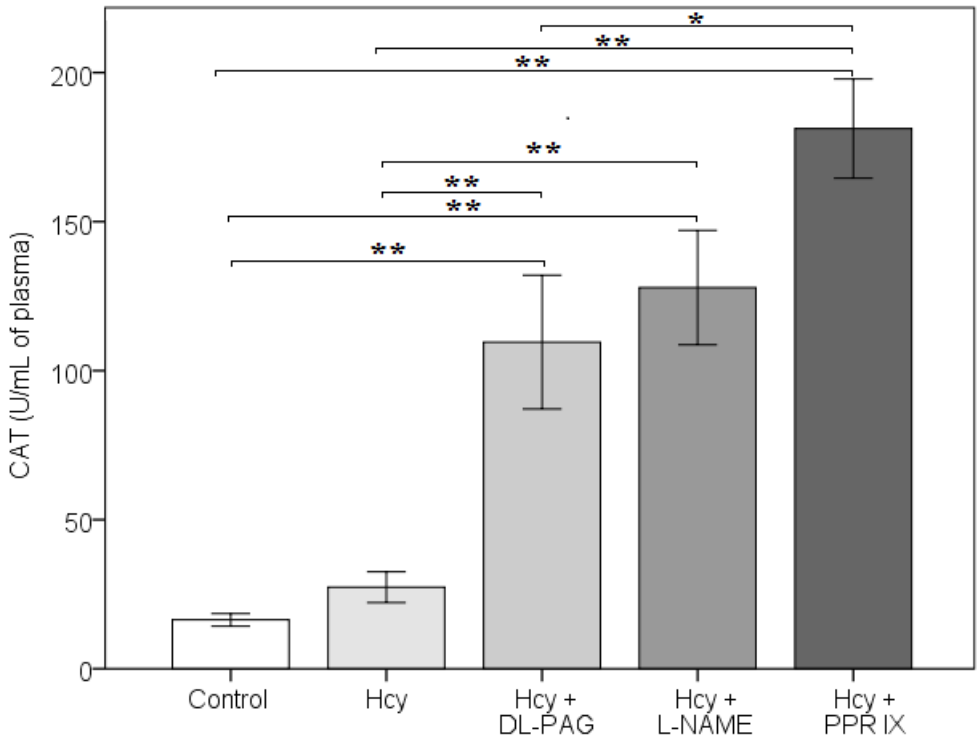
Након комбиноване апликације DL-хомоцистеина и инхибитора синтезе гасотрансмитера, у свим испитиваним групама је дошло до статистички значајног снижења вредности липидне пероксидације у плазми пацова у односу на контролну групу. Свакако, треба напоменути и да су значајно више вредности овог параметра забележене у групи пацова којој је апликована комбинација Hcy+DL PAG у односу на преостале испитиване комбинације (Hcy + L-NAME и Hcy +PPR IX), као и у односу на групу пацова третираних само DL-хомоцистеином.

Графикон 15. Ефекти комбиноване примене Hcy и DL PAG, Hcy и L-NAME, Hcy и PPR IX на активност каталазе у урину (CAT/U) пацова



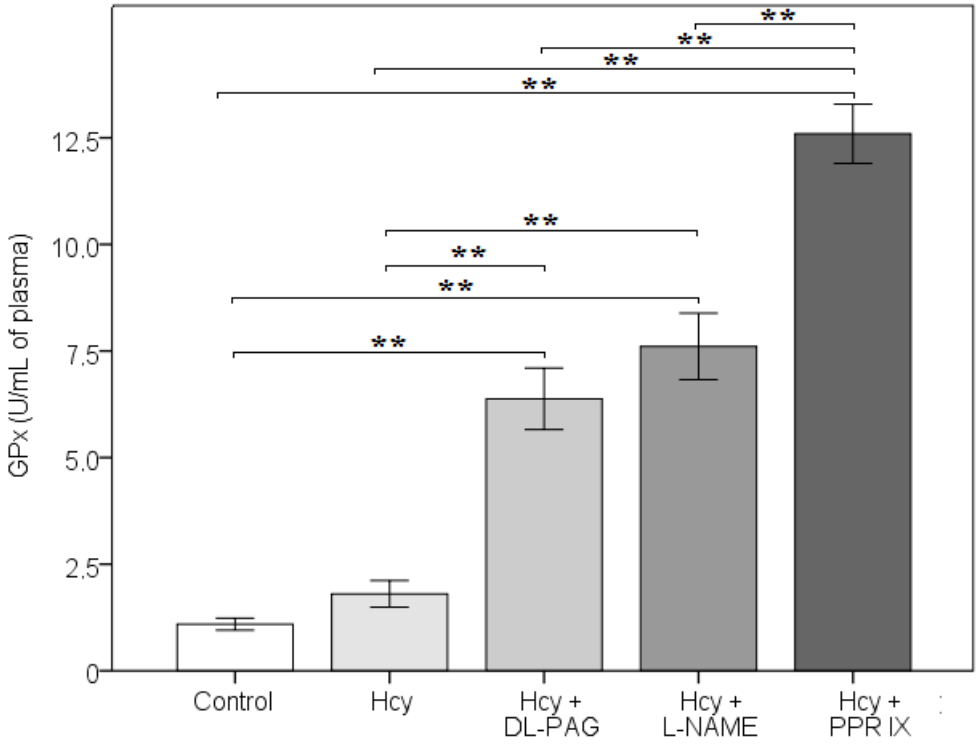
Вредности каталезе у урину пацова биле су статистички више у групама које су третиране комбинацијом Hcy+DL PAG, Hcy+L-NAME, Hcy+PPR IX у односу на контролну групу пацова, као и у односу на групу којој је апликован само Hcy. Значајно већа активност овог параметра такође је забележена у Hcy+PPR IX групи пацова у односу на Hcy+DL-PAG.

Графикон 16. Ефекти комбиноване примене Hcy и DL PAG, Hcy и L-NAME, Hcy и PPR IX на активност каталазе у плазми (CAT/плазма) пацова



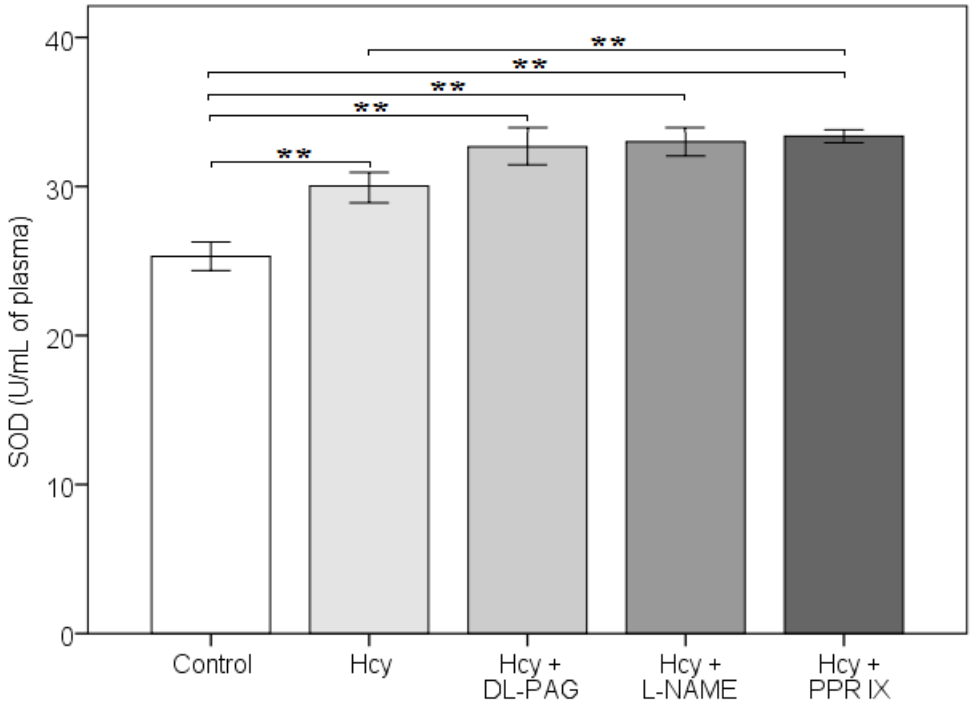
Комбинованом применом Hcy+DL PAG, Hcy+L-NAME, Hcy+PPR IX дошло је до значајног повећања активности CAT/U у поређењу са контролном и групом пацова којој је примењиван DL-хомоцистеин. Такође, значајно већа активност забележена је у групи Hcy+PPR IX у односу на Hcy+DL PAG групу пацова.

Графикон 17. Ефекти комбиноване примене Hcy и DL PAG, Hcy и L-NAME, Hcy и PPR IX на активност глутатион пероксидазе у плазми (GPx/плазми) пацова



Активност глутатион пероксидазе у плазми пацова била је статистички већа у групама третираних Hcy+DL PAG, Hcy+L-NAME, Hcy+PPR IX у односу на контролну групу пацова, као и у односу на групу којој је апликован само Hcy. Значајно већа активност овог параметра такође је забележена у Hcy+PPR IX групи пацова у односу на Hcy+DL-PAG.

Графикон 18. Ефекти комбиноване примене Hcy и DL PAG, Hcy и L-NAME, Hcy и PPR IX на активност супероксид дисмутазе у плазми (SOD/плазма) пацова



Комбинованом применом Hcy+DL PAG, Hcy+L-NAME, Hcy+PPR IX дошло је до значајног повећања супероксид дисмутазе у односу на контролну групу пацова. Значајно више вредности овог антиоксидационог ензима забележене комбинованом применом Hcy и PPR IX у односу на групу пацова којој је примењиван само Hcy.

4.2. СУБХРОНИЧНА СЕРИЈА ЕКСПЕРИМЕНАТА

4.2.1. Ефекти субхроничне хиперхомоцистеинемије на активност ензима ацетилхлинестеразе у ткиву миокарда срца пацова и параметара оксидационог стреса у плазми

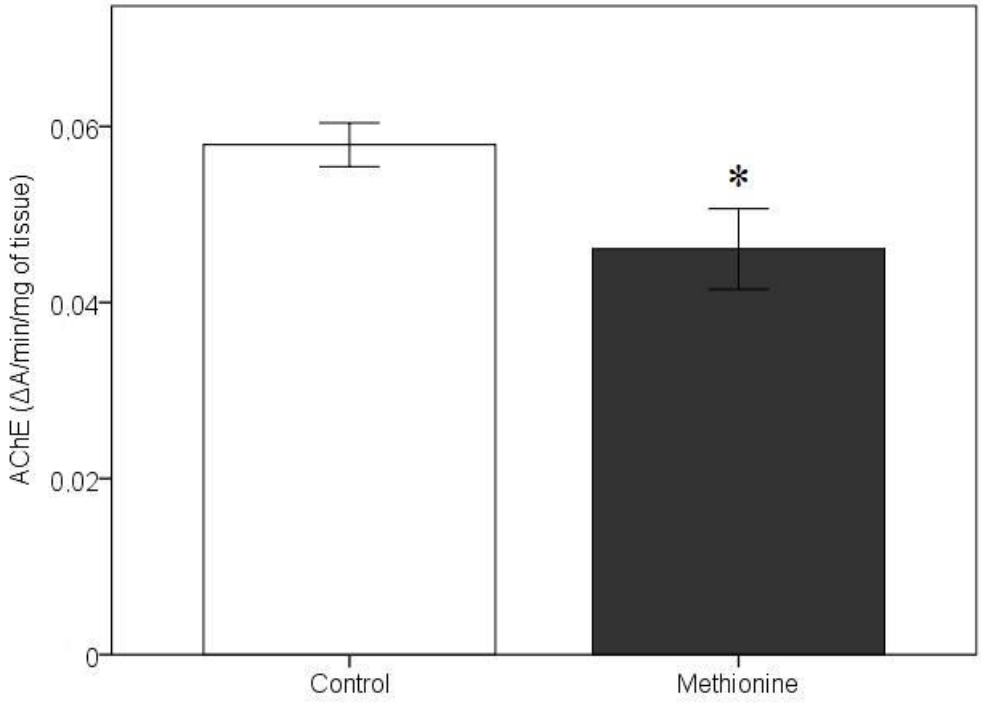
Табела 7. Регистроване вредности ацетилхолинестеразе (AChE) и параметара оксидационог стреса у плазми пацова након изазивања субхроничне хиперхомоцистеинемије

X±SD	**AChE** (ΔA/min/mg ткива)	**MDA** (nmol/ml плазме)	**CAT** (U)	**CAT** (U/ml плазме)	**GPx** (U/ml плазме)	**SOD** (U/ml плазме)
Контрола	0.057±0.002	12.56±1.38	6.61±0.51	132.22±10.37	8.81±0.69	30.09±0.82
Метионин	0.046±0.004	15.03±1.39	8.17±1.06	163.53±21.23	10.90±1.41	29.92±0.44

Табела 8. Резултати статистичке значајности приликом поређења између група (*p<0,05; **p<0,01)

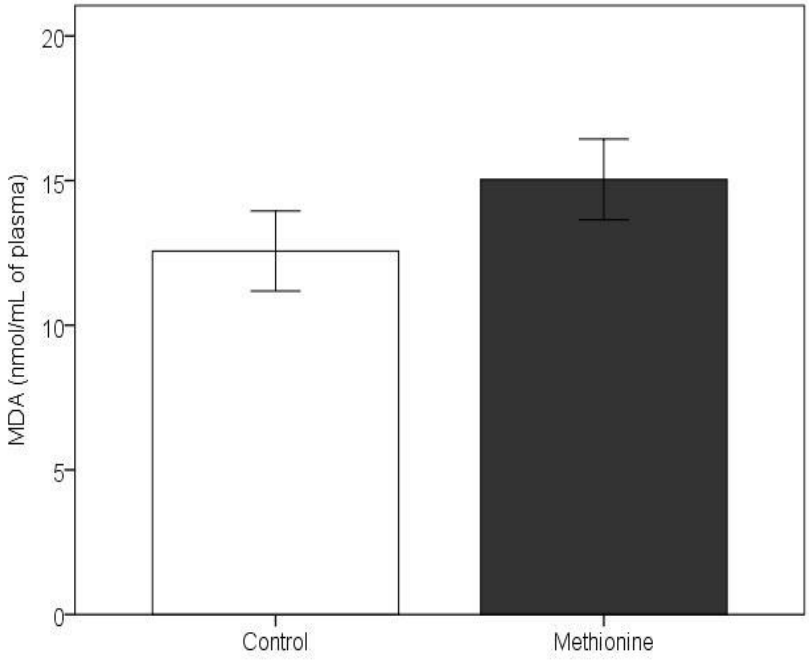
Независни Т-тест	**AChE**	**MDA**	**CAT**	**CAT** у плазми	**GPX**	**SOD**
Контрола / Метионин	*	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Графикон 19. Ефекти субхроничне хиперхомоцистеинемије (метионина) на активност ацетилхолинестеразе (AChE) у ткиву миокарда пацова



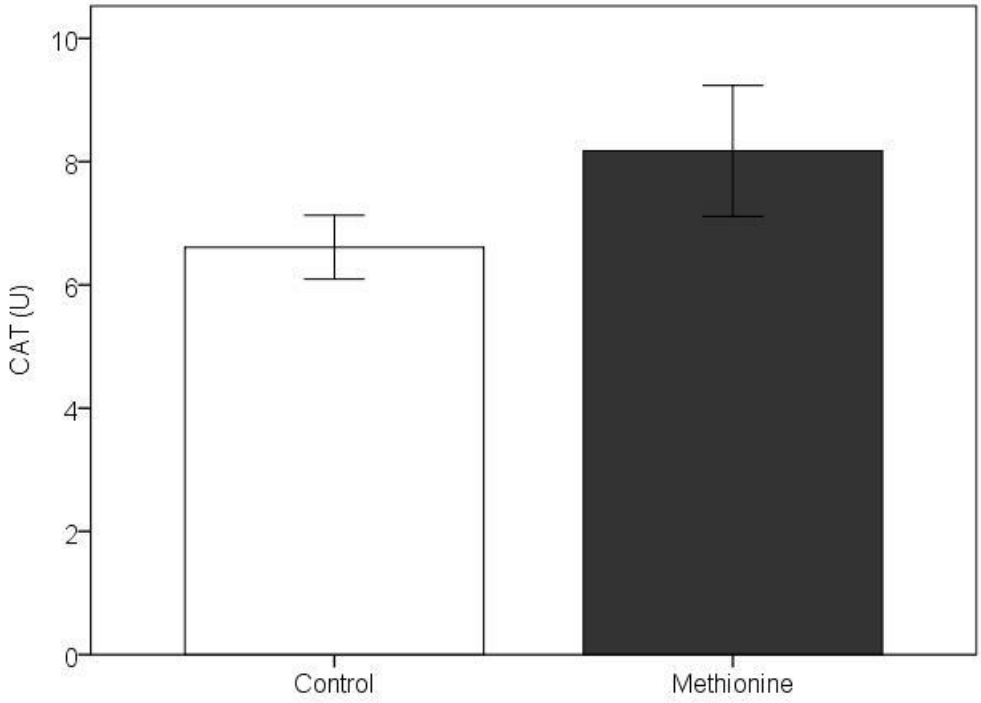
Субхронична хиперхомоцистеинемија довела је до статистички значајно снижене активности AChE у ткиву срца пацова у односу на контролну групу.

Графикон 20. Ефекти субхроничне хиперхомоцистеинемије (метионина) на активност липидне пероксидације у плазми (MDA/плазма) пацова



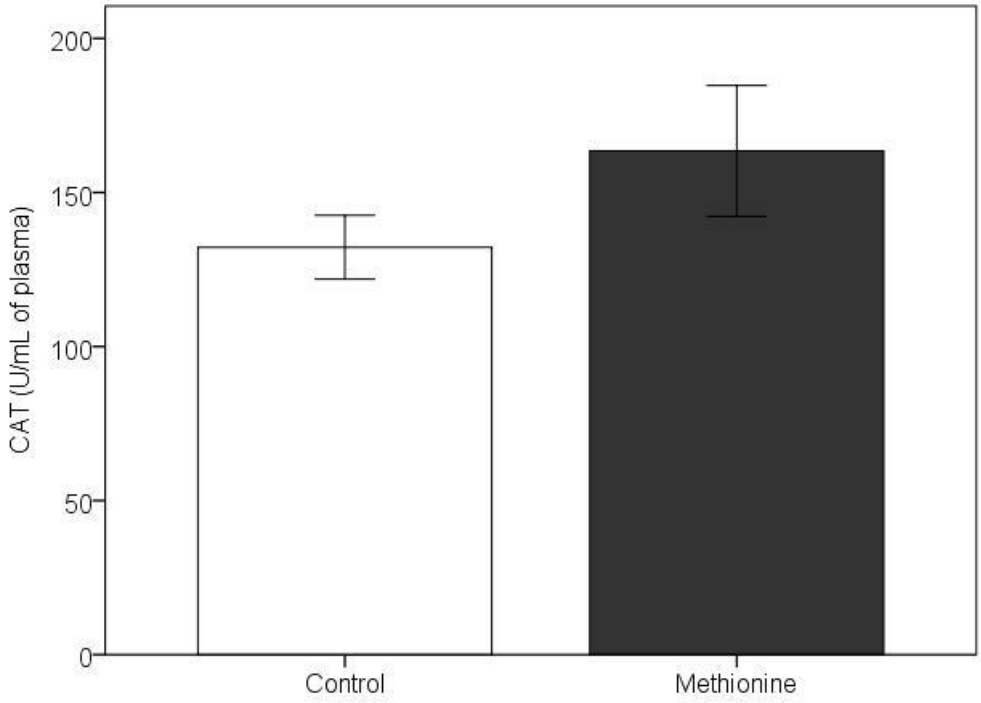
Након изазивања субхроничне хиперхомоцистеинемије код пацова, није дошло до статистички значајних разлика у активности липидне пероксидације у односу на контролну групу пацова.

Графикон 21. Ефекти субхроничне хиперхомоцистеинемије (метионина) на активност каталазе у урину (CAT/U) пацова



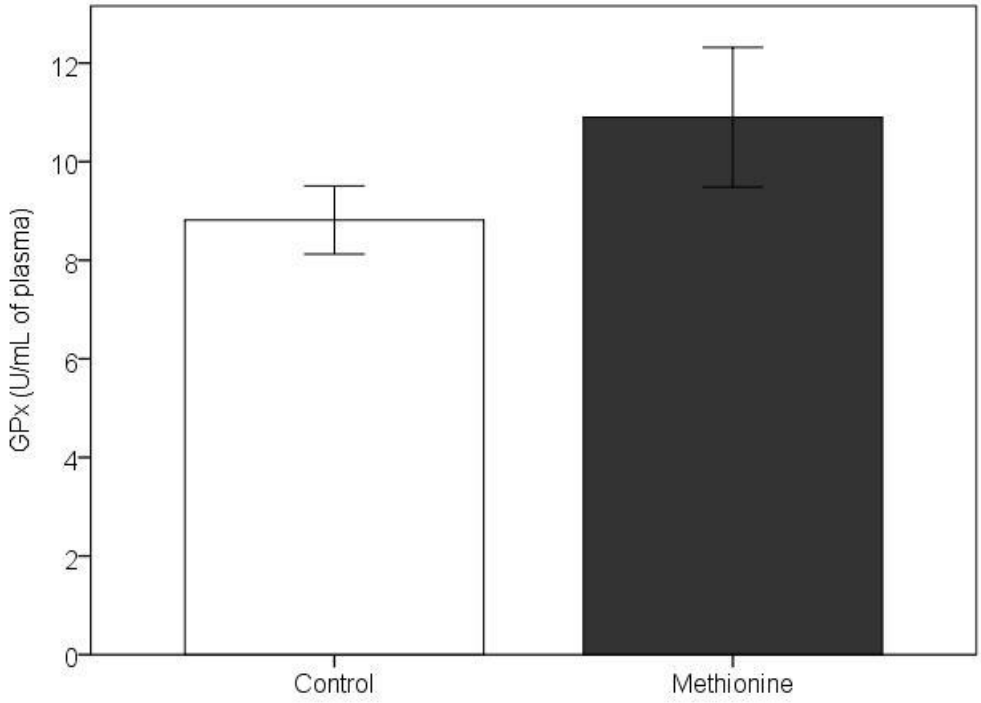
Активност каталзе у урину пацова којима је метионином изазвана субхронична хиперхомоцистеинемија статистички се не разликује у односу на контролну групу пацова.

Графикон 22. Ефекти субхроничне хиперхомоцистеинемије (метионина) на активност каталазе у плазми (CAT/плазма) пацова



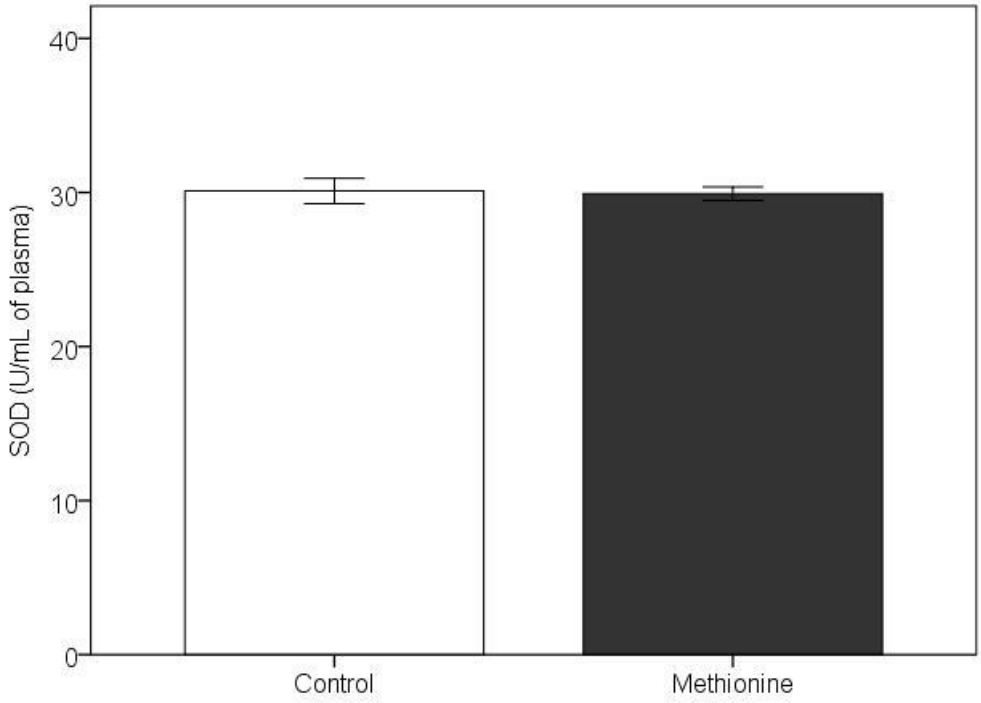
Активност каталзе у плазми код групе пацова са субхроничном хиперхомоцистеинемијом није значајно промењена у односу на контролну групу.

Графикон 23. Ефекти субхроничне хиперхомоцистеинемије (метионина) на активност глутатион пероксидазе у плазми (GPx/плазми) пацова



Апликација метионина није довела до статистички значајних промена у вредности глутатион пероксидазе у плазми у односу на контролну групу пацова.

Графикон 24. Ефекти субхроничне хиперхомоцистеинемије (метионина) на активност супероксид дисмутазе у плазми (SOD/плазма) пацова



Субхронична хиперхомоцистеинемија није довела до значајних разлика активности SOD у плазми у поређењу са контролном групом.

V

ДИСКУСИЈА

5.1. ЕФЕКТИ АКУТНЕ И СУБХРОНИЧНЕ ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈЕ НА АКТИВНОСТ ЕНЗИМА АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ У СРЧАНОМ МИШИЋУ ПАЦОВА

Садашње истраживање је усмерено ка утврђивању ефеката акутне и субхроничне хиперхомоцистеинемије на редокс равнотежу и активност ацетилхолинестеразе миокарда пацова са посебним акцентом на могући значај гасотрансмитера у добијеним ефектима. У складу са тим, задатак ове студије је био да испита утицај акутно и субхронично повишених вредности хомоцистеина на оксидациони статус и активност ацетилхолинестеразе у ткиву миокарда. Поред тога, желели смо да утврдимо улогу сигналних гасовитих молекула (NO, H_2S и CO) у поменутим ефектима хомоцистеина, са циљем разумевања комплексне интеракције ових молекула која се годинама уназад наслућује као неизбежна и значајна у потпуном сагледавању дејства хомоцистеина на различите органске системе сисара.

Као што је напоменуто један од мајоритетних циљева студије је био утврђивање утицаја акутне и субхроничне хиперхомоцистеинемије на активност ензима ацетилхолинестеразе (AChE) у срчаном мишићу пацова.

Ацетилхолинестераза припада групи серин протеаза и један је од најефикаснијих познатих ензима код сисара, јер се зна да један молекул ацетилхолинестеразе у току једног минута може да хидролизује 6 x 10^5 молекула ацетилхолина (154). Физиолошка улога овог ензима, остварена у првом реду хидролизом ацетилхолина, је представљена прекидом агонистичког деловања ацетилхолина на мускаринске и никотинске рецепторе. Активни центар ацетилхолинестеразе чине ањонско и естарско место који су дефинисани одређеном аминокиселинском секвенцом, при чему ањонско место учествује у правилној оријентацији супстрата, тј, ацетилхолина. После формирања реверзибилног комплекса, долази до реакције између ацетил групе ацетилхолина и хидроксилне групе серина.

Ацетилхолинестераза постоји у неколико изоформи (AchET, AchER и AchEH), без обзира што је код сисара продукт само једног гена, захваљујући различитим посттранслационим модификацијама и удруживању са структурним протеинима. Поред каталитичке улоге везане за ацетилхолин, показано је да овај ензим може имати и друге неензимске функције, укључујући трофичке утицаје, ефекте на ћелијску пролиферацију и диференцијацију, као и одговор на различите стимулусе, укључујући стрес. С обзиром да је ацетилхолинестераза одговорна за хидролизу ацетилхолина у

холинергичким синапсама, дејство ацетилхолина у синаптичким пукотинама зависи од активности овог ензима (155).

За разлику од можданог ткива, присуство и улога ацетилхолинестеразе у срцу сисара је много мање изучавана и позната. Експерименталне хистохемијске и биохемијске студије су утврдиле присуство ацетилхолинестеразе у ткиву срца сисара. Ове студије су открилe да је концентрација AchE већа у преткоморама у односу на коморе што може бити важно у вагусној контроли спроводног система срца (156). Са друге стране присуство ацетилхолинестеразе у вентрикулумима потврђује негативан инотропни ефекат холинергичког нервног система. Концентрација овог ензима у ткиву срца сисара је нарочито велика у региону СА чвора десне преткоморе и базе десне коморе. Осим тога, заступљеност AchE у десној преткомори је много већа него у левој. Оваква локализација ацетилхолинестеразе је у корелацији са негативним хронотропним и дромотропним утицајем вагуса.

Већина сазнања о утицају хиперхомоцистеинемије на активност холинестераза је добијена на основу малобројних *in vitro* студијама које су проучавале ову проблематику у ткиву мозга. У *in vitro* условима је показано да хиперхомоцистеинемија изазива смањену активност ацетилхолинестеразе (157). Сугерисано је да је добијена инхибиција ацетилхолинестеразе посредована оксидационим стресом (158).

Друго истраживање је показало да метионин нема ефекта, док хомоцистеин инхибира активност бутирлихолинестеразе (159). Остварена инхибиција је била по типу компетитивне инхибиције. Ин виво и ин витро студијом, Scherer и сарадници су указали да акутна хиперхомоцистеинемија инхибира активност холинестераза у серуму људи и пацова (160). Резултати домаћих аутора су сугерисали да акутна апликација хомоцистеин тиолактона у дози од 5,5 mmol/kg изазива значајно смањење активности ацетилхолинестеразе у хомогенату ткива срца, без статистички значајних ефеката на активност овог ензима у крви пацова (161). Тиме је назначена улога метаболита хомоцистеина, хомоцистеин тиолактона, као медијатора ових ефеката.

Резултати садашње студије су у сагласности са литературним подацима и показују да и акутна и субхронична хиперхомоцистеинемија изазива снижење активности ацетилхолинестеразе у срцу пацова. Такође, уочљиво је да као и у претходним анализама, не постоји разлика у добијеним ефектима између форми хомоцистеина у случају акутно повишених вредности хомоцистеина. Ови налази сугеришу да хомоцистеин путем дејства на AchE може да мења холинергичку контролу срчане функције односно да инхибицијом разградње ацетилхолина стимулише

снажнији и дуготрајнији негативни холинергички ефекат на срце (негативни хронотропни, дромотропни и инотпрони). На овај начин се може дати допринос у објашњењу штетних функционалних дејстава које хомоцистеин испољава на миокард (161). У том смислу, сазнања ове студије могу да буду од интереса за будућа базична истраживања из ове области, али и изванредна основа за велике клиничке студије које су неопходне како би садашња тема добила примењену димензију.

5.2. ЕФЕКТИ АКУТНЕ И СУБХРОНИЧНЕ ХИПЕРХОМОЦИСТЕИНЕМИЈЕ НА ОКСИДАЦИОНИ СТАТУС ПАЦОВА

Један од главних циљева студије је био да испита оксидациони статус пацова у условима акутне и субхроничне хиперхомоцистеинемије. Као што је већ поменуто подаци о утицају повишених вредности хомоцистеина на развој системског оксидациони стреса како у анималним тако и хуманим моделима су неусаглашени. Ипак, већина истраживача се слаже да хомоцистеин узрокује оксидативни стрес преко више механизама:

1. повећаном продукцијом слободних реактивних радикала,
2. атенуацијом антикосидативних система,
3. директним цитотоксичним деловањем на ендотел и проинфламаторним деловањем.

У стању хиперхомоцистеинемије слободне реактивне врсте настају услед аутооксидације хомоцистеина, продукције H_2O_2 у катаболизму хомоцистеина (162). Хомоцистеин $COOHCH(CH_2CH_2CH)NH_2$ као слободна аминокиселина може бити у редукованом (као тиол SH) или оксидованом облику (као симетрични дисулфид хомоцистин RSSR). У плазми доминира тиолни, тј. редуковани облик хомоцистеина који лако подлеже оксидацији, при чему два редукована молекула дају дисулфид, два водоникова јона (H^+) и два електорона ($2e^-$) (162): $2RSH = RSSR + 2H^+ + 2e^-$

У присуству јона метала и кисеоника може доћи до аутооксидације хомоцистеина при чему настају супероксидни и хидроксилни аањони, водоник-пероксид и тиолни слободни радикали као нпр. хомоцистеин тионолактон (циклизовани облик хомоцистеина). Тиоли у присуству јона гвожђа иницирају липидну пероксидацију, продукцију хидроксилног радикала и оксидативно модификованих протеина. Хидроксил радикали (OH^-, $OH^\bullet$) и супероксидни анјон ($O_2^{\bullet-}$), под дејством суперосид дисмутазе или спонтано, конвертују се у H_2O_2 (163). Ефекти наведеног процеса су

фаворизовани ихибишућим деловањем хомоцистеина на експресију глутатион пероксидазе (GPx-1) антиоксидативног ензима који редукује водоник-пероксид до воде. Регулација оксидације сумпорних аминокиселина важна је за заштиту интегритета ћелије. Наведени радикали могу редуковати Cu^{2+} церулоплазмина у Cu^{+}, што доводи до оксидације LDL јер изостаје протективни ефекат Cu^{2+}. Хиперхомоцистинемија (> 100 μmol/l) стимулише оксидацију LDL-а преко оксидације Cu^{2+} церулоплазмина (163).

Резултати наше студије показују да су акутно повишене вредности обе форме хомоцистеина (основног и тиолактон облика) повезане са нижим степеном липидне пероксидације мембране. Са друге стране, субхронична хиперхомоцистеинемија узрокована метионином је изазвала (иако несигинификантан) повећан степен липидног оштећења.

Липидна пероксидација настаје реакцијом слободних радикала и полинезасићених масних киселина при чему настаје липопероксил слободни радикал који напада суседну слободну масну киселину и тиме започне ланчану реакцију на нивоу целе ћелијске мембране (163). Липидну пероксидацију најчешће узрокује хидроксил радикал ($OH^{\bullet}$), иако и други радикали могу да покрену процес пероксидације. Овакво оштећење ћелијске мембране се одвија кроз три нивоа: иницијација, пропагација и терминација. Реакција молекуларног кисеоника са полинезасићеним масним киселинама (ПУФА) је спински немогућа. Због тога пероксидација започиње механизмом који укључује слободне радикале чиме се премошћује спинска препрека између кисеоника и ПУФА-е. Пероксидација липидног двослоја започиње дејством реактивних кисеоничних радикала на ПУФА путем издвајања атома H^{+} из метиленске групе. Најчешћи слободни радикали који моду да оксидују ПУФА мембране поред $OH^{\bullet}$ су $HO_2^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$ и $RO_2^{\bullet}$ (163).

У аеробним условима коњуговани диени могу да се спооје са O_2, и формирају пероксилне радикале $LOO^{\bullet}$ који даље елиминишу $H^{\bullet}$ из других ПУФА, при чему долази до настанка липидних хидропероксида (укључујући цикличке пероксиде) - фаза пропагације. Супероксид анјон радикал ($O_2^{\bullet-}$) је негативног набоја и нема способност уласка у унутрашњост ћелијске мембране (изузетак је улазак анјонским каналима, али на свом путу не реагује са ПУФА), што објашњава његово неучествовање у липидној пероксидацији. Интензивна липидна пероксидација мембрана доводи до губитка њене флуидности, снижавања вредности мембранског потенцијала, повећања пермеабилности за H^{+} и друге јоне, и у крајњем дезинтеграције ћелије (163).

Липидни пероксиди стварају многобројне разградне продукте – од алдехида, кетона, угљенводоника (етана, етена, пентана), епоксида, до активних радикала. Малондиалдехид (MDA) који је одређиван у овој студији се сматра поузданим показатељем пероксидације. MDA постоји у различитим облицима и у физиолошким условима се налази у облику енолатног јона који реагује са протеинима, показујући изразити афинитет према лизинском аминокиселинском остатку. Гуанин у молекулу DNK такође може бити циљно место напада малондиалдехида што изазива мутагене промене. У организму MDA се метаболише до малонатне киселине која је компетитивни инхибитор митохондријске сукцинат дехидрогеназе (163).

Из претходног излагања и на основу резултата наше студије се уочава следеће: 1. дуже трајање хиперхомоцистеинемије је повезано са већим степеном липидног оштећења; 2. могуће је да због акутног карактера повећања хомоцистеина није било времена за пораст концентрације оних слободних радикала који би се укључили у интеракцију са ПУФА и изазвали њихову пероксидацију. Поред тога, мањи степен липидног оштећења у условима акутне хиперхомоцистеинемије указује и да је активност антиоксидационих ензима заштите јача на почетку односно да се током дуже експозиције повишеним вредностима хомоцистеина она исцрпљује (што је и показала већина ензима у нашем истраживању у оба случаја).

Недавни резултати наше истраживачке групе су показали да хронична хиперхомоцистеинемија поготово тешког степена (> 60 μmol/L) узрокује значајно повећање липидне пероксидације код пацова третираних метионинском дијетом (са или без витамина Б комплекса) током 4 недеље (164). Међутим, приликом нашег претходног истраживања у коме су различите форме хоммоцистеина акутно апликоване у сам срчани мишић забележили смо да и основни и тиолактон облик хомоцистеина нису изазвале липидну пероксидацију мембрана кардиомиоцита (165).

Резултати других аутора су такође слични. У једној од претходно публикованих студија пацови су третирани хомоцистеином током тридесет дана у дози од 1 mg/kg. Запажено је да хронична хиперхомоцистеинемија индукује значајно повећање системске липидне пероксидације (166) што је у складу са горе наведеним закључцима.

Други сегмент праћења оксидационог статуса пацова у садашњем истраживању се огледао у одређивању плазма активности антиоксидационих ензима заштите супероксид дизмутазе, каталазе и глутатион пероксидазе (SOD, CAT и GPx). Однос хомоцистеина и ензимских компоненти антиоксидационе заштите је недовољно изучаван док су информације инконзистентне.

Преовладава мишљење да хомоцистеин може да утиче на ендогени антиоксидациони ензимски систем заштите путем два механизма који се често преклапају: 1. директна инхибиција синтезе и активности већине интраћелијских антиоксидационих ензима; 2. повећаном продукцијом слободних реактивних радикала који исрцпљују антиоксидациону активност.

Директно негативно дејство хомоцистеина на продукцију и активност антиоксидационих ензима се најлакше испољава (и најбоље је проучена) на примеру глутатионског циклуса односно глутатион пероксидазе. Хомоцистеин улази у интеракцију са глутатионом током свог метаболизма тј. транссулфурацијског пута. Поремећаји одвијања овог пута изазивају смањену продукцију глутатиона из цистеина. Поред тога, експериментални подаци су указали да хомоцистеин може да супримира експресију глутатион пероксидазе (GPx-1) директним дејством на процес транслације (167).

Исцрпљивање антиоксидационих механизама заштите може настати у случају прекомерног генерисања слободних радикала под утицајем хомоцистеина. Биохемијска основа повећане продукције про-оксиданаса током хиперхомоцистеинемије се налази у објашњењу да хомоцистеин подлеже аутоксидацији. Токсичност хомоцистеина је последица ковалетног везивања хомоцистеина за протеине које је праћено модификацијом њихове функције. Тај процес се зове хомоцистеинилација и представља посттранслациону модификацију протеина. Степен протеинске хомоцистеинилације је пропорционалан повећаном нивоу хомоцистеина у плазми. S-хомоцистеинилација је процес везивања хомоцистеина помоћу слободне тиол групе за другу слободну тиол групу која је заправо Cys остатак у протеинском молекулу при чему се формира дисулфидна веза, што значајно утиче на тиол-зависни редокс статус протеина. аутооксидацијом хомоцистеина настају кисеонична једињења: супероксид анјон радикал (O_2^-), хидроксилни радикал ($OH^\cdot$) и водоник пероксид (H_2O_2). Настали супероксид и тиол радикал су интермедијери у овој оксидоредукцији, са крајњим производом, водоник-пероксидом (167, 168).

Осим тога, сматра се да хомоцистеин индукује повећано стварање бројних оксидаза (нарочито NADPH оксидаза) у коронарном ендотелу, које су богат васкуларни извор O_2^-. Ова ROS, као изузетно токсична и реактивна, лако ступа у интеракцију са NO, што узрокује стварање још токсичнијег $ONOO^-$ (који са своје стране оштећује ендотел) и тако смањује биорасположивост NO (167, 168).

Главне компоненте ензимског антиоксидационог система заштите чине каталаза (CAT), супероксид дизмутаза (SOD) и глутатион пероксидаза (GPx). Супероксид дисмутаза представља главну линију одбране од токсичности коју ствара кисеоник у живим ћелијама. SOD је металопротеин који катализује конверзију супероксид анјон радикала у молекулски кисеоник и водоник-пероксид. Постоје четири врсте ovog ензима у зависности од метала који се налази у центру: 1. SOD која садржи гвожђе - FeSOD, 2. SOD која садржи манган - MnSOD, 3. SOD која садржи бакар и цинк - CuZnSOD и екстрацелуларна EC SOD. У ћелијама су заступљене CuZnSOD (у цитоплазми) и MnSOD (у митохондријама). У еритроцитима је присутна CuZnSOD која има функцију да уклони супероксид настао аутооксидацијом оксихемоголобина. У ендотелу, овај ензим игра веома важну улогу у заштити NO од деструкције од стране супероксида, чиме спречава и настанак $ONOO^-$ (169).

Каталаза катализује редукцију водоник пероксида у воду и молекулски кисеоник. Каталаза може да оксидује H-донора уз утрошак једног молекула водоник пероксида. Да ли ће каталаза катализовати брзу (каталазну) или спору (пероксидазну) реакцију, зависи од брзине настајање водоник пероксида као и од концентрације донора водоника (170, 171).

CAT је кључни ензим у еритроцитима одговоран за уклањање како егзогеног H_2O_2 (нпр. пореклом из дисфукционалног ендотела, ћелија укључених у инфламацију), тако и ендогеног H_2O_2 (произведеног кроз аутооксидацију оксихемоглобина). Околно ткиво може остварити ефекат на каталазну активност у еритроцитима кроз појачану емисију NO, који је инхибитор овог ензима (170, 171).

Глутатион редокс циклус представља главни пут редукције органских хидропероксида у коме централно место заузима ензим глутатион пероксидаза. Овај ензим је присутан је у свим ћелијама сисара. Постоји неколико облика овог ензима: 1. селен-зависна глутатион пероксидаза (SeGSH-Px), која редукује H_2O_2 до воде и органских хидропероксида уз присуство GSH као другог супстрата; 2. селен-независна форма која користи само органске хидропероксиде као супстрат и припада фамилији ензима глутатион-С-трансфераза (GST), која катализује реакцију коњугације GSH са разним органским једињењима, као и ензим фосфолипидхидроксипероксид глутатион пероксидаза (PH GSH-Px), која реагује само са фосфолипидним хидропероксидима (172, 173).

У еритроцитима GSH-Px има специфичну улогу да заштити ћелиску мембрану пре свега, али и хемоглобин од оксидативних оштећења. Она уклања H_2O_2 који улази

кроз мембрану (егзогени), као и H_2O_2 који настаје кроз аутооксидацију хемоглобина везаног за мембрану. Такође, за заштиту мембране је есенцијална способност GSH-Px да уклања липидне хидропероксиде, чиме се зауставља ланчана реакција липидне пероксидације (172, 173).

У нашој студији смо уочили да акутно примењени основни облик хомоцистеина изазива несигнификатно повећање активности CAT и GPx, док тиолактон евидентно и снажно стимулише појачану мобилност оба поменута ензима. Поред тога, ови налази потврђују претходно наведене литературне информације о повезаности хомоцистеина и ензима глутатионског циклуса односно ензима који имају заједнички субстрат као и GPx – CAT. Са друге стране, субхронична хиперхомоцистеинемија је изазвала такође промене у активности свих испитиваних ензима антиоксидационе заштите али без статистичке потврде. Очигледно да је као и у случају липидне пероксидације дужина експозиције повишеним вредностима хомоцистеина била одлучујућа у разлици међу добијеним резултатима. Ови резултати могу бити последица постигнуте антиоксидационе компензације тј. засићења или исцрпљења њене активности у односу на акутну хиперхомоцистенемију.

Налази наше претходне студије у којој је пацовима индукована умерена и тешка хронична хиперхомоцистеинемија четворонедељном метионинском дијетом (са или без присуства витамина Б комплекса) сугеришу да високе вредности хомоцистеина у дужем временском периоду узрокују снижење активности антиоксидационих ензима (SOD, CAT, GSH) (174).

Сазнања других студија корелирају са претпостављеном динамиком дејства хомоцистеинау односу на дужину експозиције његовим повишеним вредностима. Тако су Akgullu и сарадници између осталог испитивали утицај хроничне хиперхомоцистеинемије након четворонедељног третмана метионином на активност SOD и CAT у срчаном мишићу пацова. Запажено је да хронично повишена концентрација овог тиола индукује значајно снижење активности поменутих ензима у срцу пацова (175). На овај начин су још једном потврђени литературни подаци који су доказали да хомоцистеин (у високој концентрацији и током пролонгираног дејства) може да инхибира синтезу и активност антиоксидационих ензима.

У том смислу, може се запазити да се акутни одговор антиоксидационог ензимског система заштите на хиперхомоцистенемију огледа у порасту активности већине антиоксидационих ензима, док током дужег временског интервала повишени хомоцистеин остварује негативни ефекат на генезу и активност поменутих ензима.

5.3. АКУТНИ ЕФЕКТИ ИНХИБИТОРА СИНТЕЗЕ ГАСОТРАНСМИТЕРА (L-NAME, PPR IX И DL-PAG) НА АКТИВНОСТ ЕНЗИМА АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ У ТКИВУ МИОКАРДА СРЦА ПАЦОВА

Циљ овог дела студије је био да истражимо интеракцију гасовитих сигналних молекула (NO, CO и H_2S) и ацетилхолинестеразе односно да утврдимо потенцијални утицај ових сигналних гасова на активност AChE у срцу пацова. У том смислу, спроведена је акутна интраперитонеална апликација инхибитора сваког од гасотрансмитера (L-NAME, PPR IX и DL-PAG) како би смо испитали ефекте њихове ендогене производње тј. активност ацетилхолинестеразе у условима одсутства ових молекула.

Узајамно дејство гасотрансмитера је недовољно познато и завређује пажњу с обзиром да је током последње две деценије примећен њихов све већи значај у одржавању кардиоваскуларне хомеостазе.

У васкуларној мрежи CO изазива вазодилатацију (176), активирајући исти систем секундарних гласника (sGC-cGMP), као и NO (176). NO селективно индукује експресију HO 1 гена и последичну продукцију CO у крвним судовима (177). Способност NO да стимулише генерисање CO-а, представља потенцијални алтернативни механизам којим NO активира sGC и изазива релаксацију васкуларних глатких мишића. CO директно инхибира активност iNOS, чиме ограничава претерану синтезу NO-а, који укључујући се у реакције са слободним радикалима потенцира оксидациона оштећења (177).

У *in vitro* условима је показано да HO инхибира активност NOS и смањују нивое cGMP у присуству NO-а (178). Сматра се да CO смањује активност cGMP везивањем за sGC, чиме доводи до конформационе промене овог ензима и ремети његову спрегу са NO. Што се тиче директне инхибиције активности NOS од стране HO, претпоставља се да је HO способан да се веже за хем групу NOS-а и тако да му редукује активност, а самим тим и продукцију NO-а (179). Ова сазнања сугеришу да CO може се понаша као инхибиторни модулатор NO-cGMP сигналног система.

Са друге стране, показано је да NO двојако делује на активност HO, и инхибиторно и стимулаторно (180). Потенцијално објашњење овог наизлгед парадокса може да се пронађе у чињеници да NO као врста слободног радикала, везивањем за цистеинске остатке, индукује HO-1 експресију, док измештањем O_2^- из хем групе, инактивира HO (178). Поред тога, забележено је да NO донори селективно повећавају

експресију тРНК за HO 1 у васкуларним глатким мишићима пацова (177). Механизам којим NO повећава експресију HO-1 још увек није довољно прецизан, али се претпоставља да укључује cGMP сигнални пут (177).

Студије на културама ћелија су такође показале да егзогено унети CO блокира повећање cGMP активности који је претходно узроковао NO (178), док инхибитори ендогеног CO супротно томе, повећавају cGMP активност индуковану од стране NO. Поређења ради, Nω-nitro-L-arrinine (L-NAME), неселективни инхибитор NOS, инхибира вазодилатацију изазвану CO на in vivo анималним моделима. Каснија апликација NO донора, натријум нитропрусида, поново успоставља CO вазодилатацију (181). Ови налази нам указују да NO може бити веома значајан у остваривању васкуларних ефеката CO.

NO такође може да ступи у интеракцију и са H_2S сигналним системом. Тако на пример, вазодилататорни ефекти H_2S у васкуларним глатким мишићима могу бити делимично зависни од NO. То су доказале студије на аорти анималних модела у којима је апликацијом L-NAME, смањен вазодилататорни потенцијал H_2S (182). Интересантно да се до сличних сазнања дошло и скидањем ендотелног слоја са аортних прстена (182). Ова сазнања сугеришу да H_2S стимулише производњу NO, што последично утиче на вазорелаксативна својства H_2S. Иста истраживања су показала да применом селективног инхибитора sGC, долази до повећања вазодилататорног потенцијала H_2S, указујући да H_2S не мора обавезно своје ефекте да остварује преко sG (182).

У другим испитивањима можемо пронаћи да L-NAME не утиче на васкуларна својства H_2S-а, док комбинација H_2S и NO донора узрокује значајно већу инхибицију васкуларне констрикције у односу на њихову самосталну примену (183) што показује да одређена синергија ова два система ипак постоји.

Подаци о улози H_2S у васкуларним ефектима NO су такође контрадикторни. Док једне студије показују да H2S повећава вазорелаксацију изазвану NO (184), у друга наводе пак супротне резултате (185). Контрадикторне податке о овој интеркацији је тешко објаснити. Наиме, уколико H_2S повећава концентрацију cGMP, онда би то могло да објасни смањење ефеката NO, који делује преко овог сигналног пута. Са друге стране, ако H_2S изазива вазодилатацију независно од NO, то би могло да образложи повећање NO зависне вазорелаксације под утицајем H_2S. Даља истраживања су свакако потребна ради разјашњења који од ових механизама је доминантан и у којим условима.

Истраживања са L-цистеином (H_2S донором) су показала да H_2S инхибира пораст концентрације cGMP индукован од стране NO, док суперокид дизмутаза (SOD)

може да редукује овај инхибиторни ефекат L-цистеина (186). То значи да инхибиторни ефекат L-цистеина делом настаје као последица његове аутооксидације SOD-ом, а делом услед директне интеракције SH група са NO.

Студије на аорти пацова су забележиле да NO, на дозно зависан начин, повећава активност CBS и CSE тиме продукцију H_2S (183). Сматра се да механизам којим NO остварује овај ефекат укључује нисходну регулацију cGMP (стимулацијом GMP-зависних киназа) или директном нитролизацијом CBS и CSE. NO такође може да узрокује повећање тРНК за CSE, на начин који још увек није прецизно утврђен, али је могуће да се одвија путем NF-κB сигналног система. Још један од начина којим NO може да повећа продукцију H_2S подразумева пораст преузимања L-цистина кога индукује NO у ендотелним ћелијама (187).

За сада се најмање зна о међусобном дејству CO и H_2S система. У доступним базама података се може пронаћи само неколико студија које проучавају ову проблематику. Већина информација о интеракција ова два система се односи на дешавања у васкуларним глатким мишићима. Студије на васкуларним глатким мишићима су показале да интеракција између CO и H_2S заиста постоји. Најпре је уочено да CO може да утиче на H_2S/CSE сигналани пут. Наиме, примећено је да након примене Zn протопорфирина (ZnPP), специфицног инхибитора HO, концентрација H_2S у васкуларном глатком мишићу нагло расте (188). Ови налази указују да ендогено продуковани CO може да редукује синтезу H_2S под физиолошким условима. Механизам којим CO остварује овај ефекат још увек није познат. Једна од хипотеза је да ендогени CO смањује експресију CSE у васкуларном мишићу и тиме производњу H_2S-а (188). На тај начин, изгледа да CO изазива нисходну регулацију H_2S.

Са друге стране, очигледно је да и H_2S може да делује на CO сигнални систем. Показано је да апликација пропаргилглицина (PAG), специфичног инхибитора CSE, повећава ослобађање CO-а у васкуларном глатком мишићу (188). Поред тога, егзогени H_2S узрокује смањење нивоа карбоксихемоглобина (HbCO) у глаткој мишићној ћелији (188). Ови резултати несумњиво указују да H_2S редукује продукцију CO у физиолошким условима. На тај начин, идентично претходном односу, H_2S доводи до нисходне регулације CO. Механизам путем кога H_2S остварује свој ефекат је такође још увек нејасан. Међутим, као једно од потенцијалних објашњења се наводи инхибиција експресије HO 1 у васкуларним глатким мишићним ћелијама. На основу овога можемо увидети да оба гасотрансмитера доводе до смањења у синтези другог и за оба се као могући механизми сугеришу инхибиција ензима који су укључену у њихову

продукцију. С обзиром на скромне податке којима располажемо још увек са сигурношћу не можемо донети ни један закључак о међусобним односима ова два сигнална система, за чије разумевање је потребно спровести нова и методолошки комплекснија истраживања.

Утицај гасних неуротрансмитера на функцију ацетилхолинестеразе је веома мало проучаван док су добијени подаци неусаглашени. Највише сазнања из ове тематике потиче из повезаности AchE и NO сингалног пута. До сада је познато да NO сигнални систем и AchE/Ach систем могу да остваре интеракцију. Тако је доказано да донор азот моноксид (спермин NONO-ат) изазива инхибицију кортикалне AchE активности (189). Поред тога, у мишићним ткивима апликација NO донорима (S-нитрозо-N-ацетил-DL-пеницилaмин, SNAP) такође изазива супресију AchE активности (190).

Други аутори су указали да активација NMDA рецептора од стране глутамата и глицина путем инфлукса јона калцијума стимулише NOS на нивоу неуромускуларне спојнице. На овај начин продуковани азот моноксид потом може да модулира синаптичку активност AchE у смислу парцијалне инхибиције (191).

Интересантан је податак да AchE посредством AC/cAMP/PKC сигнализације може да мења излазак NO из ћелије и самим тим да ремети његове биолошке ефекте у физиолошким и патофизилошким стањима (192).

Наши резултати показују да је блокада продукције NO и CO гасотрансмитера повезана са снижењем активности ацетилхолинестеразе. Ова сазнања индикују да за разлику од H_2S, NO и CO сигнални путеви могу да имају улогу у модулацији активности овог ензима. На основу наших налаза се уочава да је овај ефекат био најизраженији у случају NO сигнализације.

5.4. АКУТНИ ЕФЕКТИ ИНХИБИТОРА СИНТЕЗЕ ГАСОТРАНСМИТЕРА (L-NAME, PPR IX И DL-PAG) НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА У ПЛАЗМИ ПАЦОВА

Интеракција гасотрансмитера и слободних радикала може да буде од великог значаја у разумевању молекулских догађаја који учествују у одржавању физиолошких функција срца и крвних судова али и претходе развоју многих патофизиолошких процеса у кардиоваскуларном систему сисара. Управо зато смо желели да испитамо на који начин спречавање синтезе ових сигналних гасова може да модулира ослобађање испитиваних биомаркера оксидационог стреса у плазми пацова.

Узајамно дејство NO са слободним радикалима је добро познато и неколико пута поменуто у претходном делу текста. Обзиром да се о повезаности остала два гасотрансмитера и слободних радикала мало зна, покушаћемо да мало детаљније анализирамо њихове односе. За разлику од NO-а који се лако везује за слободне радикале и ствара још штетније продукте ($ONOO^-$), CO може да поседује и цитопротективна својства. У појединим студијама постоји повезаност између повећане продукције CO и смањеног ћелијског оштећења слободним радикалима (193). CO такође може имати улогу у заштити од оксидационих оштећења приликом акутне фазе инфламације (194).

Показано је да повећање активности HO 1 може бити повезано са побољшањем антиоксидационе заштите усмерене против $ONOO^-$ (195) и супресије адхезије леукоцита за ендотелне ћелије (196). Антиоксидациона својства HO 1 се пре свега приписују настанку билирубина, који се ствара заједно са CO током процеса разградње хема. Повећана продукција билирубина под утицајем хиперекспресије HO 1 знатно побољшава резистентност ћелија на оксидациона оштећења (197). Истраживања *in vitro* су указала да овај пигмент спречава ћелијска оштећења од стране H_2O_2 и $OHOO^-$ (198). Обзиром да је оксидациони стрес укључен у патогенезу бројних васкуларних поремећаја ова својства HO 1 могу бити изузетно корисна у одржавању физиолошке морфологије и функције ендотела.

Претпоставља се да потенцијални механизам путем кога HO 1 остварује своја антиоксидациона својства подразумева супродстављање повећаној производњи NO и RNS (199). HO детектује повишене концетрације RNS и, на још увек непознат начин, их неутралише. То су потврдиле студије на културама ћелија аорте у којима је примећено да акумулирање NO и RNS узрокује пораст експресије и активности HO 1 (200).

Ипак, механизам којим NO утиче на HO 1 систем није још увек у потпуности расветљен. На основу претходних сазнања је предложено да интеракција NO са $O_2^{\bullet-}$ као и конверија NO у NO^+ или NO^- могу бити кључни догађаји у повећању експресије гена за HO 1 (201).

Са друге стране, о корелацији H_2S и слободних радикала се најмање зна. Иако H_2S није слободни радикал, слично као и •NO, у воденом раствору се понаша као редукујући агенс, што значи да би требало да поседује антиоксидациона својства. Међутим, постоје подаци да у присуству H_2O_2, H_2S продукује тиолне слободне радикале SH• и S• (202). Ови подаци указују да се H_2S синтетише локално у високим концетрацијама и да испољава цитотоксични ефекат, слично као и NO. Показано је такође да H_2S може да утиче на јетрине ензиме укључене у метаболизам ксенобиотика (203), чиме последично утиче и на имунски систем. Ово може бити нарочито изражено у стањима повећане продукције ROS и RNS (204). То даље сугерише да H_2S може да делује и као инфламаторни медијатор, иако о томе још нема публикованих резултата.

Очигледно да повезаност гасотрансмитерских система и слободних радикала свакако постоји. Евидентне су и разлике у ефектима гасотрансмитера на оксидациони стрес. Док CO систем изгледа да делује антиоксидаионо, остала два система лако ступају у реакције са слободним радикалима и делују супротно.

Садашњи резултати сугеришу да је акутна блокада ендогене продукције NO и H_2S повезана са смањењем липидне пероксидације. Снижено оштећење ћелијске мембране се може објаснити снажним порастом активности испитиваних ензима антиоксидационе заштите који је примећен у условима ове блокаде. На тај начин очигледно је да током супресије синтезе гасотрансмитера настаје повећана ензимска заштита од оксидационог стреса. Будући да се најјачи ефекат постиже инхибицијом синтезе H_2S, чини се да сигнални пут овог гасотрансмитера има доминантну улогу у модулацији активности антиоксидационог система заштите. Ови налази показују да приликом одсуства дејства сигналних гасова настаје појачана мобилност ензимских антиоксиданаса.

У ранијем истраживању наше истраживачке групе су изолована срца пацова акутно третирана инхибиторима синтезе сва три гасотрансмитера. Забележено је да инхибиција синтезе CO изазвала смањење вредности индекса липидне пероксидације што је у корелацији са садашњим резултатима. За разлику од тога, блокада продукције H_2S није изазвала битније промене у вредностима овог параметра (205).

Gao-а и сарадници су користећи модел исхемијско-реперфузионог оштећења на срцима пацова са стрептозоцином-изазваним дијабетесом, испитивали утицај егзогеног (NaHS) и ендогеног H_2S (DL PAG) на развој оксидационог стреса током исхемије и реперфузије миокарда. Они су показали да H_2S донор, NaHS, смањује липидну пероксидацију (206).

Са друге стране, Xu је са својом истраживачком групом између осталог проучавао утицај хроничне блокаде (L-NAME) или стимулације производње NO-а (L-аргинин) на синтезу SOD-а и CAT у коморном миокарду пацова. У истраживању је закључено да инхибиција продукције азот моноксида може бити повезана са смањеном продукцијом оба ензима, док је примена L-аргинина остала без ефекта (207). Супротно овим сазнањима, Uzun и коаутори су нешто раније показали да примена L-NAME-а изазива велики пораст активности антиоксидационих ензима (SOD, CAT и GSH) (208). Ипак они су применили L-NAME у 50 пута већој дози од оне у претходној студији, а ензими су одређивани у ткиву јетре (208).

Недавно истраживање на ткиву миокарда пацова је указало да H_2S сингални пут може да буде од значаја у контролисању локалног оксидационог статуса. Тако је донор поменутог гасотрансмитера NaHS након хроничне примене подигао активност SOD, CAT и GSH а снизио концентрацију MDA (209). За разлику од услова примене егзогеног H_2S, након хроничне блокаде ендогене продукције овог сигналног молекула (хидроксиламин) добијен је потпуно супротан ефекат у смислу потенцирања оксидационог оштећења срца услед повећаног ослобађања про-оксиданаса и/или пада активности антиоксиданаса (209).

Без обзира на разлике у налазима свих наведених студија (које потичу пре свега од другачијег дизајна) јасно је да сигнални гасовити молекули могу да утичу на оксидациону хомеостазу у срцу сисара и да делују на оба фактора овог динамичког еквилибријума: про- и анти-оксидансе.

5.5. АКУТНИ ЕФЕКТИ КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ DL-ХОМОЦИСТЕИНА И ИНХИБИТОРА СИНТЕЗЕ ГАСОТРАНСМИТЕРА НА АКТИВНОСТ ЕНЗИМА АЦЕТИЛХОЛИНЕСТЕРАЗЕ У ТКИВУ МИОКАРДА СРЦА ПАЦОВА

Ради утврђивања улоге гасотрансмитера у ефектима које хомоцистеин остварује на активност ацетилхолинестеразе у срцу пацова, DL-хомоцистеин је акутно апликован са инхибиторима сваког од три испитивана сигнална гасовита молекула (L-NAME, PPR IX и DL-PAG). Утицај интеракције хомоцистеина и NO, CO и H_2S, је мало изучаван и тиме познат, поготово на нивоу срчаног мишића.

У доступним базама података готово да нема релевантних студија које су проучавале активност AchE приликом комбинације акутну или хроничну хиперхомоцистеинемију са блокадом синтезе неког од гасторансмитера. Ова чињеница свакако потврђује оригиналност садашње студије али и отежава коментарисање резултата у смислу међусобне компарације. Једно од ретких истраживање које је имало сличан дизајн су спровели Kumar и коаутори. Они су показали да хронична хиперхомоцистеинемија изазива снижење активности ацетилхолинестеразе у ткиву мозга пацова (210).

Од свих гасотрансмитера азот моноксид најлакше реагује са хомоцистеином и то у условима повишене концентрације овог тиола. Доказано је да хиперхомоцистеинемија негативно делује на азот моноксид синтазу (NOS) и тиме умањује производњу NO-а. Редукцијом биорасположивости азот моноксида стимулишу се процеси који за последицу имају развој ендотелне дисфункције (210). Поред овог дејства хомоцистеин може директно да снизи концентрацију азот моноксида путем реакције тиолних група са овим гасом (210).

У садашњој студији смо забележили да је приликом блокаде синтезе сва три гасотрансмитера хомоцистеин значајно повећао активност ацетилхолинестеразе у односу на услове када је био апликован *per se*. Најевидентији пораст активности овог ензима је уочен у случају одсуства дејства CO. Ови резултати сугеришу да сигнални гасови могу да мењају ефекте хомоцистеина на холинергичку контролу унутар срца. Поред тога, изгледа да угљен моноксид може да буде најважнији гасотрансмитер који има улогу у модулацији дејстава хомоцистеина на срчану активност AchE.

Као што је већ напоменуто, осим азот моноксида, водоник сулфид представља други гасотрансмитер са којим хомоцистеин може бити повезан и то управо током свог метаболизма када транссулфурацијским путем из цистеина настаје водоник сулфид. Због тога је у овом истраживању коришћен PPR IX као инхибитор ензима цистатион гама лиазе (cystathionine γ-lyase (GCL) који заједно са цистатион бета синтазом и 3-меркаптопируват сулфтрансферазом у транссулфурацијском путу продукују H_2S.

У литератури се наилази на истраживање у коме је испитивана улога егзогеног водоник сулфида (NaHS) у ефектима хомоцистеина на ацетилхолинестеразну активност у мождану ткиву миша (211). Хомоцистеин и донор водоник сулфида су апликовани у дози од 0.5μm/μl и 30μM/kg/дан током седам дана. Аутори су показали да је овако изазвана хиперхомоцистеинемија узроковала повећану мождану активност AchE, док примена H_2S није успела да промени овај ефекат хомоцистеина односно да утиче на остварено дејство овог тиола.

Сумарно посматрано, налази садашње студије указују да редукција срчане AchE активности под утицајем хомоцистеина прелази у значајн пораст приликом заједничке апликације са инхибиторима H_2S али и осталих испитиваних гасотрансмитера. Ова сазнања индикују да потенцирање холинергичких дејстава хомоцистеина у срцу не само да престаје у условима одсуства деловања гасотрансмитера, већ постаје неутралисано односно смањено захваљујући појачаној разградњи ацетилхолина.

На овај начин је још једном потврђена улога гасотрансмитера у ефектима хомоцистеина на срце. На основу наших сазнања можемо да претпоставимо да ендогено продуковани сигнални гаосовити молекули не представљају заштитни фактор у негативним дејствима које повишени хомоцистеин остварује на срце пацова.

5.6. АКУТНИ ЕФЕКТИ КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ DL-ХОМОЦИСТЕИНА И ИНХИБИТОРА СИНТЕЗЕ ГАСОТРАНСМИТЕРА НА ПАРАМЕТРЕ ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА У ПЛАЗМИ ПАЦОВА

Последњи задатак овог истраживања је био утврђивање улоге гасотрансмитера у дејствима акутно повишеног хомоцистеина на редокс равнотежу пацова. Као и у претходном случају, од интереса је било испитивање ендогено синтетисаних сигналних молекула због чега су примењени инхибитори њихове продукције (L-NAME, PPR IX и DL-PAG).

Интеракција про-оксидационих маркера, сигналних гасовитих молекула и хомоцистеина, у оквиру срчаног ткива је још увек недовољно истражена. Ова међусобна дејства су још увек најбоље проучена на нивоу васкуларног ендотела. Претпоставља се да негативни ефекат на ендотел крвних судова хомоцистеина остварује кроз генерисање супероксид анјон радикала (O_2^-) и водоник пероксида (H_2O_2). Након генерисања O_2^- да реагује са NO и да формира један од најтоксичнијих ROS - пероксинитрит ($ONOO^-$) (212). С обзиром да се приликом продукције $ONOO^-$ троши NO, редукује се његова концентрација што у крајњем изазива ендотелну дисфункцију (213). Поред тога, токсични облик хомоцистеина - тиолактон може да блокира активност iNOS у нервном систему (214).

Повезаност H_2S са ROS је позната тек однедавно. Истраживања су показала да овај сигнални гас може да има неуропротеткивна дејства од оксидационог оштећења (215). путем интеракције са различитим RNS и са $ONOO^-$ (216). Такође, недавно је уочено да овај гасотрансмитер штити различита ткива од оксидационих оштећења током исхемијско/реперфузионе повреде (216). Анти-оксидациони ефекат H_2S постиже на два начина: 1. блокадом транспорта електрона у респираторном ланцу митохондрија, 2. повећањем активности SOD (216).

Мали је број студија које су успеле да испитају међусобни утицај CO и оксидационог стреса у условима хиперхомоцистеинемије. Показано је да хомоцистеин има способност да изазове повећано стварање ROS у ендоплазматском ретикулуму (ЕР) ендотелних ћелија умбиликалне вене, што у крајњем доводи до апоптозе ових ћелија (217). Егзогена апликација поменутог гасотрансмитера, међутим, спречава експресију тзв. CHOP протеина чиме зауставља развој ендоплазматског оксидационог стреса и цео апоптотички процес (217).

Познато је да хомоцистеин ван ћелије може да подлегне процесу ауто-оксидације стимулише пордукцију различитих ROS (O_2^-, H_2O_2, $OH^\cdot$) (218), тако да функционише као екстрацелуларни оксиданс. Ипак, постоје докази да овај тиол и у ћелијама такође може да изазове стварање ROS активацијом мембранских NADPH оксидаза. Појачан активност овог ензима што узрокује веће стварање O_2^-, (219).

Са друге стране, ендотелна NOS (eNOS), може да буде значајан генератор продукције ROS. NOS функционише као катализатор транспорта електрона са H-терминалног везујућег места NADPH донора редукујућег домена, на C-терминалну простетичку хем групу оксидујућег домена. Неопходан кофактор за транспорт електрона од стране NOS је тетрахидробиоптерин (BH4). Гвожђе из хем групе и BH4 катализују реакцију кисеоника са L-аргинином, као последица чега настаје NO (220).

Један од начина на који настаје O_2^- је поремећај поменутог транспорта електрона и њихово усмеравање ка директној редукцији молекуларног кисеоника. Дефицијентна количина BH4 и/или L-аргинина могу да буду одговорни за поремећену синтезу NO и појачану производњу O_2^-. Пероксинитрит може да оксидује BH4, што мења редокс стање eNOS, који почиње са производњом O_2^-. Када нема довољно L-аргинина, NOSs као субстрат користи молекуларни кисеоник чиме се стимулише производња O_2^- (220).

Промену активности азот моноксид синтазе и последичну продукцију O_2^-. може да изазове и хомоцистеин. Оксидација BH4 коју стимулише хомоцистеин узрокује поремећај активности eNOS који са своје стране опет генерише појчану производњу слободних радикала (221). Други механизам путем кога хомоцистеин утиче на eNOS да продукује O_2^- подразумева оксидацију протеинских транспортера што редукује улазак L-аргинина у ћелије (222). Следећи механизам деловања хомоцистеина на NOS представља инхибицију диметиларгинин диметил-аминохидролазе (DDAH) од стране овог тиола. DDAH блокира разградњу ADMA-у која је ендогени инхибитор NOS. Након тога због повећане концентрације ADMA може да се веже за L-аргинин везујућа места NOSs, чиме се снижава синтеза азот моноксида (223). Иако азот моноксид углавном остварује корисна дејства у кардиоваскуларном систему, приликом повећане концентрације O_2^-, овај гасотрансмитер заједно са њим ствара поменути $ONOO^-$, који наставља оксидациона оштећења (223). Интереференцијом са NFκβ сигналним путем хомоцистеин повећава експресију iNOS и тиме синтезу NO у васкуларним глатким мишићима. Овако настали NO ипак не делује протективно и учествује у процесима који стимулишу генерисање слободних радикала (224).

Због својих каркатеристика и могућности интеракције са SH групама хомоцистеина, азот моноксид може да утиче на дејства овог тиола. Повећано ослобађање NO представља заштитни одговор ендотелних ћелија који је усмерен против хомоцистеина. Азот моноксид је у стању да се веже за хомоцистеин и измени његов механизам дејства. Настали С-нитрозо-хомоцистеин поседује снажни релаксантни ефекат на глатке мишиће крвних судова (220).

Мали је број истраживања која су се бавила проблематиком улоге NOS у дејствима хомоцистеина на оксидациони статус у кардиоваскуларном систему. У једној од студија је проучаван значај NOS у оксидационим оштећењима ендотелних ћелија које је индуковао хомоцистеин. Забележено је да L-хомоцистеин изазива пораст липидне пероксидације и повећану продукцију O_2^-, док вредности H_2O_2 нису биле промењене. Ов ефекти су били неутралисани апликацијом L-NAME-а, што је ауторе навело на претпоставку да NOS може даима улогу у прооксидационим механизмима хомоцистеина (225).

Резултати садашње студије су показали да инхибиција синтезе NO-а није променила ефекте акутне хиперхомоцистеинмије на липидну пероксидацију срца пацова. У условима одсуства деловања азот моноксида повишени хомоцистеин се повезује са још нижим степеном липидне пероксидације у односу на контролне услове. Осим тога, у случају блокаде функције NO система, акутно повишени хомоцистеин још јаче повећава активност свих антиоксидационих ензима заштите (SOD-а не значајно). Ова сазнања сугеришу да у случају престанка дејства NO акутно повишени хомоцистеин наставља да још интензивније испољава своје ефекте, што сугерише да сигнални пут овог гасотрансмитера може да има улогу у ефектима хомоцистеина на редокс равнотежу срца пацова.

Студија Живковића и коаутора сугерише да акутна примена више облика хомоцистеина (DL-Hcy, L-Hcy, DL- Hcy TLHC) са L-NAME-ом узрокује смањену продукцију про-оксиданата у изолованом срцу пацова и тиме липидну пероксидацију (205).

Као што је претходно поменуто интеракција хомоцистеина и угљен моноксида је најмање позната. Једно од истраживања које се бавило овом тематиком је испитивало дејство угљен моноксида на интраћелијски оксидациони стрес културе ендотелних ћелија који је индуковао хомоцистеин (50 μmol/l) (217). Аутори су закључили да егзогени угљен моноксид услед стимулације активности HO 1 изазива генезу ћелијског CO што је у наставку спречило унутарћелијска оксидациона оштећења изазавана

хомоцистеином. На овај начин ћелија не покреће отпочињање програмиране ћелијске смрти чиме се објашњава заштитни утицај CO (217).

NADPH оксидаза представља ензим ћелијске мембране који дејством многобројних фактора може да произведе велике количине слободних радикала, нарочито O_2^- (226). Стимулуси за појачану активност NADPH оксидаза могу да буду управо хомоцистеин и угљен моноксид (226, 219). Ово нас наводи на претпоставку да NADPH оксидаза може да буде синергистички активирана уколико постоје повишене концентрације хомоцистеина и CO. Последица овако удружене стимулације NADPH оксидазе је снажна производња ROS. С обзиром на сва сазнања изгледа да HO/CO сигнални систем може да има значај у дејствима хомоцистеина на редокс равнотежу.

Налази нашег претходног истраживања су показали да акутна хиперхомоцистеинемија у условима одсуства CO није мењала вредности TBARS-а у изолованом срцу пацова (205). Такође смо уочили да је приликом инхибиције синтезе CO, продукција већине про-оксидационих маркера била снижена, што истиче његова потенцијална про-оксидациона својства.

Резултати садашње студије су показали да приликом блокаде функције HO 1/CO сигналног система, акутна хиперхомоцистеинемија још више снижава липидну пероксидацију са једне стране, док са друге стране снажније мобилише активност ензима антиоксидационе заштите. На тај начин, изгледа да у одсуству деловања углен моноксида акутно повишени хомоцистеин испољава још јача дејства на редокс равнотежу пацова.

Као и у претходним случајевима, резултати међусобно корелирају односно смањење липидне пероксидације се може објаснити повећаном активношћу антиоксидационог система заштите и обрнуто.

На крају како је метаболичка повезаност водоник сулфида и хомоцистеина већ доказана, очекује се да и овај гас може да модулира дејства хомоцистеина на редокс равнотежу у срцу сисара. Осим тога, забележено је да ендотелне ћелије могу да продукују CBS и CSE ензиме који синтетишу H_2S из хомоцистеина (227). Ова синтеза је нарочито изражена у условима хиперхомоцистеинемије што представља заштитни механизам путем кога се ендотел супротставља оксидационим оштећењима под утицајем повишеног хомоцистеина (227).

Резултати нашег ранијег истраживања су показали да заједничка админитрација DL Hcy и DL PAG узрокује пораст концентрације TBARS. Такође, H_2S не доприноси развоју оксидационог стреса у миокарду и коронарној циркулацији, већ изгледа да поседује одређени антиоксидациони капацитет (205).

На основу налаза ове студије се уочава да је за разлику од претходна два случаја, акутно примењени хомоцистеин је у условима блокаде синтезе водоник сулфида изазвао пораст липидне пероксидације у односу на његову самосталну примену која ипак није прешла контролне вредности. У том смислу, излгеда да одсуство дејства H_2S може да мења ефекте хомоцистеина на начин супротан од NO и CO. За разлику од овога, утицај акутне хомоцистеинемије на испитиване антиоксидационе ензиме је приликом блокаде CSE/H_2S сигналног пута била такође још израженији (у односу на његов ефекат *per se*) у смислу веће активности ових ензима.

Сумарно посматрано ова сазнања сугеришу да сва три сигнална молекула могу да имају улогу у ефектима хомоцистеина на редокс равнотежу пацова. Поред тога, уколико узмемо у обзир величину промене ефекта примећује се да блокада HO 1/CO сигналног пута у нашем експерименталном протоколу може да има најизраженију улогу у оствареним дејствима хомоцистеина.

VI

ЗАКЉУЧЦИ

На основу свега изложеног у овој студији можемо извести следеће закључке:

1. Акутна и субхронична хиперхомоцистеинемија су биле повезане са снижењем активности ацетилхолинестеразе у срцу пацова. Ови налази сугеришу да хомоцистеин путем дејства на AchE може да мења холинергичку контролу срчане функције односно да инхибицијом разградње ацетилхолина потенцира снажнији и дуготрајнији негативни холинергички ефекат на срце.
2. Акутно повишене вредности обе форме хомоцистеина (основног и тиолактон облика) нису изазвале оштећења ћелијских мембрана већ су повезане са нижим степеном липидне пероксидације.
3. Субхронична хиперхомоцистеинемија узрокована метионином је изазвала несигинификантно повећан степен липидног оштећења.
4. Акутно примењени основни облик хомоцистеина изазива несигнификатно повећање активности CAT и GPx, док токсични тиолактон облик евидентно и снажно стимулише појачану мобилност оба поменута ензима.
5. Блокада продукције NO и CO гасотрансмитера је била повезана са снижењем активности ацетилхолинестеразе. Ова сазнања индикују NO и CO сигнални путеви могу да имају улогу у модулацији активности овог ензима. На основу наших налаза се уочава да је овај ефекат био најизраженији у случају NO сигнализације.
6. Акутна блокада синтезе NO и H_2S је повезана са смањењем липидне пероксидације и повећањем активности испитиваних ензима антиоксидационе заштите. На тај начин очигледно је да током супресије синтезе гасотрансмитера настаје повећана ензимска заштита од оксидационог стреса. Будући да се најјачи ефекат постиже инхибицијом синтезе H_2S, чини се да сигнални пут овог гасотрансмитера има доминантну улогу у модулацији активности антиоксидационог система заштите.
7. Редукција срчане AchE активности под утицајем хомоцистеина прелази у значајн пораст приликом заједничке апликације са инхибиторима производње гасотрансмитера. Ова сазнања индикују да потенцирање холинергичких дејстава хомоцистеина у срцу не само да престаје у условима одсуства деловања гасотрансмитера, већ постаје смањено захваљујући појачаној разградњи ацетилхолина.

8. У условима одсуства деловања азот моноксида повишени хомоцистеин се повезује са још нижим степеном липидне пероксидације у односу на контролне услове. Осим тога, у случају блокаде функције NO система, акутно повишени хомоцистеин још јаче повећава активност свих антиоксидационих ензима заштите (SOD-а не значајно).
9. Приликом блокаде функције HO 1/CO сигналног система, акутна хиперхомоцистеинемија још више снижава липидну пероксидацију са једне стране, док са друге стране снажније мобилише активност ензима антиоксидационе заштите. На тај начин, изгледа да у одсуству деловања углен моноксида акутно повишени хомоцистеин испољава израженија дејства на редокс равнотежу пацова.
10. Акутно примењени хомоцистеин је у условима блокаде синтезе водоник сулфида изазвао пораст липидне пероксидације у односу на његову самосталну примену. У том смислу, изгледа да одсуство дејства H_2S може да мења ефекте хомоцистеина на начин супротан од NO и CO. За разлику од овога, утицај акутне хомоцистеинемије на испитиване антиоксидационе ензиме је приликом блокаде CSE/H_2S сигналног пута била такође још израженији (у односу на његов ефекат *per se*) у смислу веће активности ових ензима.

VII ЛИТЕРАТУРА

1. Roberts JT, Caserio MC. Basic Principals of Organic Chemistry. New York and Amsterdam: WA. Benjamen,Inc., 1965; 747–58.
2. Streitweisser A, Heathcock CH. Introduction to Organic Chemistry. New York: Macmillan Publishing Co., 1985;756–60.
3. Jocelyn PC. The Biochemistry of the SH Group. London: Academic Press, 1972.
4. Friedman M. The Chemistry and Biochemistry of the Sulfhydryl Group in Amino Acids, Peptids, and Proteins.Pergamon Press, 1973.
5. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. J Nutr Biochem 1990; 1; 228 – 37.
6. Ueland PM, Refsum H, Brattstrom L. Atreriosclerotic Cardiovascular Disease, Hemostasis and Endothelial Function. New York: Marcel Decker, 1992; 183–96.
7. Mudd SH, Levy HL,Skovby F.The Methabolic Basis ofInherited Diseases. New York: M c -Grow-Hill, 1989;693–734.
8. Mudd SH, Pool JR. Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. Metabolism 1975;24: 721–35.
9. Backlund PS, Smith RA. Metionine Synthesis from 5--methylthioadenosine in rat liver. J Biol Chem 1981;256: 1533–35.
10. Malinow MR, Axthelm MK, Meredith MJ, Macdonald NA, Upson BM. Synthesis and trannssulfuration of homocysteine in blood. J Lab Clin Med 1994; 123; 421–9:
11. Wang J, Dudman NPM, Wilcken DEL, Lynch JF. Homocysteine catabolism: Levels of 3 enzymes in cultured human vascular endothelium and their relevance to vascular disease. Arteriosclerosis 1992; 97: 97–106.
12. McCully KS. Homocysteine theory of arteriosclerosis: Development and current status. Athreroscl rev 1983;11: 157–246.
13. Wagner C, Briggs WY, Cook RJ. Inhibition of glycine N-methyltransferase by folate derivatives: Implications for the regulation of methyl group metabolism. Biochem Biophys Res Commun 1985; 127: 746–52.
14. McKeever MP, Weir DG, Molloy A, Scott JM. Betainehomocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat.Clin Sci 1991; 81: 551–6.
15. Goyette P, Summer JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R. Human methylentetrahydrofolate reductase; isolation of c-DNA mapping and

mutation identification. Nature Genet 1994; 7: 195–200.

16. Refsum H, Guttormsen AB, Fiskerstrand T, Ueland PM. On the formation and fate of total plasma homocysteine.In: Graham I, Refsum H, Rosenberg IH, Ueland PM, eds.Homocysteine Metabolism: From Basic Science to Clinical Medicine. Boston: Kluwer Academic Publishers,1997; 23–9.
17. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA. A candidate genetic risk factor vascular disease: a common mutation in methylentetrahydrofolate reductase. Nature Genetics 1995; 10: 111–3.
18. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. Disorders of Transsulfuration. In: The Metabolic Basis of Inherited Disease,6th edition, Scriver CR, Beaudet AT, Sly WS, and Valle D, eds, McGraw-Hill, 1989; 2049–64.
19. McDonald MC, Dempsey GI, Nassar BA. Relation of a Common Mutation in Methylenetetrahydrofolate Reductaze to Plasma Homocysteine and Early Onset Coronary Artery Disease. Clin Biochem 1998; 31: 95 – 100.
20. Kang SS, Wong PWK, Zhou J, Sora J, Ruggie N, Grevich G. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patients with coronary artery disease. Metabolism1991; 37: 611–13.
21. Ubbink JB, Vermaak WJ, van der Merwe, Becker PJ. The effect of the blood sample, aging and food consumption on plasma total homocysteine levels. Clin Chem Acta 1992; 207: 119 – 28.
22. Brattstrom LE, Israelsson B, Jeppsson JO, Hultberg BL. Folic acid-an inno-cuous means to reduce plasma homocysteine. Scand J Clin Lab Invest 1998; 48: 215–21.
23. Hultberg B, Agardh CD, Agardh E, Lovestami-Adrian M. Poor metabolic folate deficiency are associated with increasing levels og plasma homocysteine in insulin dependent diabettes mellitus. A five-year follow-up study. Scand J Clin Lab Invest 1997; 57: 595–600.
24. Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M, JI J, Otto MJ, Taylor ML. Rapid HPLC Determination of Total Homocysteine and Other Thiols in Serum and Plasma: Sex Differences and Correlation with and Folate Concentrations in Healthy Subjects. Clin Chem 1994; 40: 873–81.
25. Hulberg B, Agardh E, Andersson A. Increased levels of plasma homocysteine are associated with nephropathy, but not severe retinopapathy in type 1 diabetes mellitus.

Scand J Clin Lab Invest 1991; 51: 277–82.

26. Bertino JR. Ode de methotrxate. J Cli Oncol. 1993; 11: 5-14. Allegrac CH, Fine RL, Drake JC, Chabner BA. The effect of metotrerexate on intracellular folate pools in human MCF-7 breast cancer cells. Evidence for direct inhibition of purine synthesis. J Biol Chem 1987; 261:6478 – 85.
27. Kobblin DD. Toxicity of nitrous oxide. In: Rice SA, Fish KJ. Anestetic Toxity. Ravev Press 1994, 135 – 55.
28. Rasmussen K, Moller J. Total homocysteine in clinical practice. Ann Clin Biochem 2000; 37: 627–48.
29. Daly D, Miller LW, Nadeau MR, Selhud J. The effect of acute L-dopa administration on plasma homocysteine levels in folate repleted and depleted rats. FASEB J 1989; 43: 77–90.
30. Milatovic B and van der Mooren MJ. Homocysteine in Postmenopausal Women and the Importance of Hormone Replacement Therapy. Clin Chem Lab Med 2001; 39 (8): 764–7.
31. Dastur DK, Dave UP. Effect of prolonged anticonvulsant medication in epileptic patients: serum lipids, vitamins B6, B12 and folic acid, proteins and fine structure of the liver. Epilepsia 1987; 28: 147–59.
32. Blankenhorn DH, Malinow MR, Mack WJ. Colestipol plus niacin therapy elevates plasma homocysteine levels. Coron Art Dis 1991; 2: 357–60.
33. Hultberg B, Berglund M, Andersson A, Frank A. Elevated plasma homocysteine in alcoholics. Alcohol Clin Exp Res 1993; 17: 687–9.
34. Hultberg B, Andersson A, Masson P, Larson M, Tunek A. Plasma homovcysteine and thiol compound fractions after oral administration of n-acetylcysteine. Scand J Clin Lab Invest 1994; 54: 417–22.
35. Clarke R, Woodhouse P, Ulvik A, Frost C, Sherliker P, Refsum H, Ueland PM, Khaw KT. Variability and determinanys of total homocysteine concentrations in plasma in an elderly population. Clin Chem 1998; 44: 102–7.
36. Bostom AG, Jacques PF, Nadeau MR, Williams RR, Ellison RC, Selhub J. Post-methionine load hyperhomocysteinemia in persons with normal fasting total plasma homocysteine: initial results from the NHLBI Family Heart Study. Atherosclerosis 1995; 116: 147–51.

37. Moller J, Rasmussen K. Homocysteine in plasma: stabilisation of blood samples with fluoride. Clin Chem 1995;41: 759–68.
38. Probst R, Brtandl R, Blumke M, Neumeier D. Stabilization of homocysteine concentration in whole blood.Clin Chem 1998; 44: 1567–9.
39. Michel G, Staub U, Schroeder G, Shih J, and the International Hcy group. Determination of Homocysteine Reference Intervals: Data From the European Automated FPIA Study. Clin Lab 1999; 45: 651–6.
40. Graeme J Hankey, John W Eikelboom. Homocysteine and vascular disease. The Lancet 1999; 354: 407–13.
41. Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocysteinemia as risk factor for occlusive vascular disease. Annu Rev Nutr 1992; 43: 1279–98.
42. Pietrzik K, Bronstrup A. Causes and consequences of hyperhomocysteinemia. Int J vitam Nutr Res 1997; 67:389–95.
43. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. Annu Rev Med 1998; 49: 31–62.
44. Wu LL, Wu J, Hunt Sc, James BC, Vincent GM, Williamss RR. Plasma homocysteine as a risk factor for early familial coronary artery disease. Clin Chem 1994;40: 552–61.
45. Israelsson B, Brattstrom LE, Hultberg BL. Homocysteine and myocardial infarction. Atherosclerosis 1988;71: 227–33.
46. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. Lancet 1999; 354: 407–13.
47. Jacobsen DW, Gatautis VJ, Green R, Robinson K, Savon SR, Secic M. Sylvia de Jong. Hyperhomocysteinemia in Patients with Peripheral Arterial Occlusive Disease. Clin Che Lab Med 2001; 39: 714–6.
48. Ubbink JB, Vermaak WJ, Delport R, van der Merwe, Becker PJ, Potgieter H. Effective homocysteine metabolism may protect South African black against coronary heart disease. Am J Clin Nutr 1995; 62: 802–8.
49. Vermaak WJ, Ubbink JB, Delport R, Becker PJ, Bissport SH, Ungerer JP. Ethnic Immunity to coronary Heart Disease. Atherosclerosis 1991; 89: 155–62.
50. Obeid OA, Mannan N, Perry G, Iles RA, Boucher BJ. Homocysteine in healty east London Bangladeshis. Lancet 1998; 352: 1829–30.
51. den Heijer M. Hyperhomocysteinaemia as a risk factor for venous thrombosis: an

update of the current evidence. Clin Chem Lab Med. 2003;41(11):1404-7.

52. McCord JM. The evolution of free radicals and oxydative stress. American Journal of Medicine, 2000; 108:652-659.
53. Halliwell B, Gutteridge, JMC. (2007) Free radicals in biology and medicine 4th edition. Oxford University Press Inc, New York, USA.
54. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem. Biol. Interact 2006; 160: 1–40.
55. Halliwell B. Free Radicals and other reactive species in Disease. (2001). Encyclopedia of life sciences, National University of Singapore, Singapore.
56. Linas SL, Whittenburg D, Repine JF. Role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion injury. American Journal of Physiology, 1990; 258:711-716.
57. Shaw S, Jayatilleke E. The role of aldehyde oxidase in ethanol-induced hepatic lipid peorxidation in the rat. Biochemical Journal, 1990; 268:579-583.
58. Fleury C, Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondrial reactive oxygen speces in cell death signaling. Biochemistry, 2002; 84:131-141.
59. Babior BM, Lamberth JD, Nauseff W. The neutrophil NADH oxidase.Archives of Biochemistry and Biophysics, 2002; 397: 242-344.
60. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radical Biology Medicine, 2001; 3: 1287-1312.
61. Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. Trends in Pharmacological Science, 2005; 26:190–195.
62. Zhao J, Liu XJ, Ma JW, Zheng RL. DNA damage in healthy term neonate. Early Human Development, 2004; 77:89-98.
63. Auroma OI. Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. JAOCS, 1998; 75 (2).
64. Stadtman ER. Role of oxidant species in aging. Currents in Medical Chemistry, 2004; 11: 1105–1112.
65. Marshall TA, Roberts RJ. In vitro and in vivo assessment of lipid peroxidation of infant nutrient preparations; effect of nutrition on oxygen toxicity. Journal of American College of Nutrition, 1990; 9:190-199.
66. Anderson E, Katunga L, Willis M. Mitochondria as a Source and Target of Lipid Peroxidation Products in Healthy and Diseased Heart. Clinical and Experimental

Pharmacology and Physiology, 2012; 39: 1440-1681.

67. Parola M, Leonarduzzi G, Robino G, Albano E, Poli G, Dianzani MU. On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by longstanding cholestasis. Free Radical Biology and Medicine, 1996; 20:351-357.
68. Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. Journal of the Association of Physicians of India, 2004; 52:794–804.
69. Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC. Mechanisms of Aging: An appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free Radical Biological Medicine, 2002; 33:575–86.
70. Ku HH, Brunk UT, Sohal RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. Free Radical Biology Medicine, 1993; 15:621–627.
71. Piantadosi CA, Zhang J. Mitochondrial generation of reactive oxygenspecies after brain ischemia in the rat. Stroke, 1996; 27:327–32.
72. Simms NR, Anderson MF. Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke. Neurochemistry International, 2002; 40:511–26.
73. Mariani E, Polidori MC, Cherubini A., Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. Journal Chromaography B, 2005; 827:65–75.
74. Cherubini A, Vigna GB, Zuliani G, Ruggiero C, Senin U, Fellin R. Role of antioxidants an atherosclerosis: epidemiological and clinical update. Current Pharmaceutical Design, 2005; 11:2017–2032.
75. Galle J, Hansen-Hagge T, Wanner C, Seibold S. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. Atherosclerosis, 2006; 185:219–26.
76. Bellomo G, Mirabelli F. Oxidative stress and cytoskeletal alterations. Annual NY Academy Science, 1992; 663:97–109.
77. Völkel W, Sicilia T, Pähler A, Gsell W, Tatschner T, Jellinger K, Leblhuber F, Riederer P, Lutz WK, Gotz ME. Increased brain levels of 4-hydroxy-2-nonenal glutathione conjugates in severe Alzheimer’s disease. Neurochemistry International, 2006; 48:679–686.
78. Korolainen MA, Goldsteins G, Tuula A, Alafuzoff I, Koistinaho J, Pirttila T. Oxidative modifi cation of proteins in the frontal cortex of Alzheimer’s disease brain.

Neurobiology of Aging, 2006; 27:42–53.

79. Wersinger C, Sidhu A. Inflammation and Parkinson’s disease. Current Drug Targets Inflammation and Allergy, 2002; 1:221–242.
80. Jay D, Hitomi H, Griendling KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. Free Radical Bioloogy Medicine, 2006; 40:183–92.
81. Izzotti A, Bagnis A, Saccà SC. The role of oxidative stress in glaucoma. Mutation Research, 2006; 612:105–114.
82. Đorđević VB, Pavlović DD, Kocić GM. (2000): Biohemija Slobodnih Radikala. Niš: Medicinski fakultet.
83. Nozaik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA. Extracellular superoxide dismutase. International Journal of Biochem and Cell Biology, 2005; 37:2466-2471.
84. Yan H, Harding JJ. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. Biochemical Journal, 1997; 328:599-605.
85. Arnao MB, Acosta M, del Rio JA, Varon R, Garcia-Canovas F. Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent. Biochmica et Biophysica Acta, 1990; 1038:85-89.
86. Harel M, Schalk I, Ehret-Sabatier L, Bouet F, Goeldner M, Hirth C, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(19):9031-5.
87. Quinn DM. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. Chemical Review 19897; 87 (5): 955–79.
88. Tripathi A. Acetylcholinsterase: A Versatile Enzyme of Nervous System. Annals of Neuroscience 2008; 15 (4).
89. Barton L, Parker K, Blumenthal D, Buxton I, Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics, The McGraw Hill Companies, New York, 2008
90. Katzung B, Masters S, Trevor A, Basic and clinical pharmacology, 12th Edition, The McGraw Hill Companies, New York, 2012.
91. Drachman D, Isselbacher, K.J., Braunwald, E., Wilson, J.D., Martin, J.B., Fauci, A.S. Kasper, D.L., eds (1998). Harrison's Principles of Internal Medicine (14th ed.). The McCraw-Hill Companies. pp: 2469–2472.
92. Pohanka. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. Biomedical Papers Olomouc 2011; 155 (3): 219–229.

93. Massoulié J, Perrier N, Noureddine H, Liang D, Bon S. Old and new questions about cholinesterases. Chem Biol Interact 2008; 175 (1–3): 30–44.
94. Shepherd JT and Vanhoutte PM. The Human Cardiovascular System. New York: Raven, 1979.
95. González R, Campos EO, Morán S, Inestrosa NC. Characterization of acetylcholinesterase from human heart auricles: Evidence for the presence of a G-form sensitive to phosphatidylinositol-specific phospholipase c. 1991; 22 (1): 30–44.
96. Hancock JC, Hoover DB, Hougland MW. Distribution of muscarinic receptors and acetylcholinesterase in the rat heart. Auton Nerv Sys J 1987; 19(1); 59-66.
97. Raj SR, Black BK, Biaggioni I, Harris PA, Robertson D. Acetylcholinesterase inhibition improves tachycardia in postural tachycardia syndrome. Circulation. 2005; 111(21):2734-40.
98. Lataro RM, Silva CA, Tefé-Silva C, Prado CM, Salgado HC. Acetylcholinesterase Inhibition Attenuates the Development of Hypertension and Inflammation in Spontaneously Hypertensive Rats. Am J Hypertens. 2015;28(10):1201-8.
99. Gillman MA, Lichtigfeld FJ. A comparison of the effects of morphine sulphate and nitrous oxide analgesia on chronic pain states in man. J. Neurol. Sci. 1981; 49 (1): 41–5.
100. Ori C., Ford-Rice F and London E.D. Effects of nitrous oxide and halothane on mu and kappa opioid receptors in guinea-pig brain. Anesthesiology 1989; 70: 541-544.
101. Wang R (ed). Signal Transduction and the Gasotransmitters: NO, CO and H_2S in Biology and Medicine. 2004, Humana Press, New Jersey, USA.
102. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980;288:373–376.
103. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. Br. J. Pharmacol 2006;147:S193–S201.
104. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 1987;84:9265–9269.
105. Bredt DS. Nitric oxide signaling specificity—the heart of the problem. J. Cell Sci 2003;116:9–15.
106. Knowles, R. G.; Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. The

Biochemical journal. 298 (Pt 2) (Pt 2): 249–258.

107. Gusarov I, Starodubtseva M, Wang ZQ, McQuade L, Lippard SJ, Stuehr DJ, Nudler E (May 2008). Bacterial Nitric-oxide Synthases Operate without a Dedicated Redox Partner. J. Biol. Chem. 283 (19): 13140–7.
108. Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol 2006;46:235–276.
109. Ignarro L.J. (2001): Nitric Oxide. A Novel Signal Transduction Mechanism For Transcellular Communication; 16: 477- 483.
110. Taqatqeh, F; Mergia, E; Neitz, A; Eysel, UT; Koesling, D; Mittmann, T (2009). "More than a retrograde messenger: nitric oxide needs two cGMP pathways to induce hippocampal long-term potentiation.". Journal of Neuroscience 29 (29): 9344–50.
111. Groneberg D, König P, Lies B, et al. Cell-Specific Deletion of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase Reveals a Dual Pathway for Nitrergic Neuromuscular Transmission in the Murine Fundus. Gastroenterology. 2013 Mar 22. doi:pii: S0016-5085(13)00420-4. 10.1053/j.gastro.2013.03.042. [Epub ahead of print].
112. Tiurenkov IN, Perfilova VN, Arsenova NV. Effect of immobilization-painful stress on cardiac ino- and chronotropic functions of animals under the conditions of nitric oxide synthesis suppression. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova. 2012 Sep;98(9):1131-9.
113. Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? Nat. Rev. Mol. Cell Biol 2002;3:214–220.
114. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. Nat. Rev. Mol. Cell Biol 2005;6:150–166.
115. Santhanam L, Lim HK, Lim HK, et al. Inducible NO synthase dependent S-nitrosylation and activation of arginase1 contribute to age-related endothelial dysfunction. Circ. Res 2007;101:692–702.
116. Wolosker H, Dumin E, Balan L, Foltyn VN. D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration. FEBS J 2008;275:3514–3526.
117. Durham WJ, Aracena-Parks P, Long C, et al. RyR1 S-Nitrosylation underlies environmental heat stroke and sudden death in Y522S RyR1 knockin mice. Cell 2008;133:53–65.
118. Stroissnigg H, Trancíková A, Descovich L, et al. S-Nitrosylation of micro-tubule-

associated protein 1B mediates nitric-oxide-induced axon retraction. Nat. Cell Biol 2007; 9:1035–1045.

119. Hara MR, Agrawal N, Kim SF, et al. S-Nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. Nat. Cell Biol 2005;7:665–674.
120. Yoshida T, Inoue R, Morii T, et al. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-Nitrosylation. Nat. Chem. Biol 2006;2:596–607.
121. Kim SF, Huri DA, Snyder SH. Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. Science 2005;310:1966–1970.
122. Blumenthal Ivan (2001). Carbon monoxide poisoning. J R Soc Med (The Royal Society of Medicine) 94 (6): 270–272.
123. Verma A, Hirsch D, Glatt C, Ronnett G, Snyder S. Carbon monoxide: A putative neural messenger. Science 1993; 259 (5093): 381–4.
124. Otterbein LE, Bach FH, Alam Jet al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. Nat. Med 2000;6:422–428.
125. Otterbein LE, Zuckerbraun BS, Haga M, et al. Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. Nat. Med 2003;9:183–190.
126. Chin BY, Jiang G, Wegiel B, et al. Hypoxia-inducible factor 1α stabilization by carbon monoxide results in cytoprotective preconditioning. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2007;104:5109–5114.
127. Boehning D, Sedaghat L, Sedlak TW, Snyder SH. Heme oxygenase-2 is activated by calcium-calmodulin. J. Biol. Chem 2004;279:30927–30930.
128. Boehning D, Moon C, Sharma S, et al. Carbon monoxide neurotransmission activated by CK2 phosphorylation of heme oxygenase-2. Neuron 2003;40:129–137.
129. Zakhary R, Gaine SP, Dinerman JL, Ruat M, Flavahan NA, Snyder SH. Heme oxygenase 2: Endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 1996;93:795–798.
130. Boehning D, Snyder SH. Novel neural modulators. Annu. Rev. Neurosci 2003;26:105–131.
131. Battish R, Cao GY, Lynn RB, Chakder S, Rattan S. Heme oxygenase-2 distribution in anorectum: Colocalization with neuronal nitric oxide synthase. Am. J. Physiol.

Gastrointest. Liver Physiol 2000;278:G148–G155.

132. Lee YC, Martin E, Murad F. Human recombinant soluble guanylyl cyclase: Expression, purification, and regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2000;97:10763–10768.
133. Zakhary R, Poss KD, Jaffrey SR, Ferris CD, Tonegawa S, Snyder SH. Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 1997;94:14848–14853.
134. Reinking J, Lam MM, Pardee K, et al. The Drosophila nuclear receptor E75 contains heme and is gas responsive. Cell 2005;122:195–207.
135. Dioum EM, Rutter J, Tuckerman JR, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez MA, McKnight SL. NPAS2: A gas-responsive transcription factor. Science 2002; 298:2385–2387.
136. Sastre C, Baillif-Couniou V, Kintz P, et al. Fatal accidental hydrogen sulfide poisoning: a domestic case. J Forensic Sci. 2013 Jan;58 Suppl 1:S280-4.
137. Kabil O, Banerjee R. Redox biochemistry of hydrogen sulfide. J Biol Chem 2010; 285: 21903-21907.
138. Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, et al. H_2S as a Physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. Science 2008; 322: 587-590.
139. Eto K. Ogasawara M, Umemura K, Nagai Y, Kimura H. Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation. J Neurosci 2002; 22: 3386-3391.
140. Łowicka E, Bełtowski J. Hydrogen sulfide (H_2S) - the third gas of interest for pharmacologists. Pharmacol Rep 2007; 59: 4-24.
141. Olson KR, Dombkowski RA, Russell MJ, et al. Hydrogen sulfide as an oxygen sensor/transducer in vertebrate hypoxic vasoconstriction and hypoxic vasodilation. J Exp Biol 2006; 209: 4011-4023.
142. Wang R. Two's company, three's a crowd: Can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter? FASEB J 2002;16:1792–1798.
143. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. EMBO J 2001;20:6008–6016.
144. Mustafa AK, Gadalla MM, Snyder SH. Signaling by gasotransmitters. Sci Signal. 2009 Apr 28;2(68):re2.
145. Pavlikova M, Kovalska M, Tatarkova Z, Sivonova-Kmetova M, Kaplan P, Lehotsky

J. Response of secretory pathways Ca^{2+} ATPase gene expression to hyperhomocysteinemia and/or ischemic preconditioning in rat cerebral cortex and hippocampus. Gen Physiol Biophys. 2011;30 Spec No:S61-9.

146. Ningjun Li, Li Chen, Rachel W. Muh, Pin-Lan Li. Hyperhomocysteinemia Associated With Decreased Renal Transsulfuration Activity in Dahl S Rats. Hypertension. 2006; 47: 1094-1100
147. Ellman GL, Courtney KD, Andres VJr, Feather-Stone RM (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88–95.
148. Aruoma OI, Halliwell B, Laughton MJ, Quinlan GJ, Gutteridge JMC. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron (II)- iron (III) complex. Biochem J. 1989;258:617-20.
149. Beutler E. Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods. 3rd ed. New York: Grune Startton; 1984. 133 p.
150. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem. 1972;247:3170-5.
151. Wendel A. Enzymatic basis of detoxication. 1st ed. New York: Academic Press; 1980. 333 p.
152. da Cunha AA, Scherer E, da Cunha MJ, Schmitz F, Machado FR, Lima DD, Delwing D, Wyse AT. Acute hyperhomocysteinemia alters the coagulation system and oxidative status in the blood of rats. Mol Cell Biochem. 2012; 360(1-2): 205-14.
153. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. Behavior Research Methods 2007; 39: 175-91.
154. Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. Acetylcholine. The Biochemical Basis of Neuropharmacology. Oxford University Press, New York, 2003.
155. Prado MA, Reis RA, Prado VF, de Mello MC, Gomez MV, de Mello FG. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. Neurochem Int. 2002;41(5):291-9.
156. Hancock JC, Hoover DB, Hougland MW. Distribution of muscarinic receptors and acetylcholinesterase in the rat heart. Autonoн Nerv Sys J, 1987; 19: 59-66.

157. Schulpis K, Kalimeris K, Bakogiannis C, Tsakiris T, Tsakiris S. The effect of in vitro homocystinuria on the suckling rat hippocampal acetylcholinesterase. Metab Brain Dis 2006; 21(1):21-28.
158. Stefanello FM, Zugno AI, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT. Homocysteine inhibits butyrylcholinesterase activity in rat serum. Metab Brain Dis. 2003;18(3):187-94.
159. Scherer EB, da Cunha AA, Kolling J, da Cunha MJ, Schmitz F, Sitta A, Lima DD, Delwing D, Vargas CR, Wyse AT. Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage. Int J Dev Neurosci.2011;29(7):693-9.
160. Petrović M, Fufanović I, Elezović I, Čolović M, Krstić D, Jakovljević V, Đurić D. Efekti homocistein tiolaktona na aktivnost acetilholinesteraze u mozgu, krvi i srcu pacova. Serb J Exp Clin Res. 2010; 11(1):19-22.
161. Zivkovic V, Jakovljevic V, Pechanova O, Srejovic I, Joksimovic J, Selakovic D, Barudzic N, Djuric DM. Effects of DL-homocysteine thiolactone on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in the isolated rat heart: the role of different gasotransmitters. Biomed Res Int. 2013;2013:318471.
162. Vučinić B, Radovanović D, Čanović D, Pavlović M, Lazić D, Spasić M, Milošević B, Dimić S, Mitrović B. The role of hyperhomocysteinemia in the development of postoperative vascular complications. Med J 2016; 50(2):54-62.
163. Štefan L, Tepšić T, Zavidić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipid peroxidation - causes and consequences. Medicina 2007;43:84-93.
164. Nikolic T, Zivkovic V, Srejovic I, Stojic I, Jeremic N, Jeremic J, Radonjic K, Stankovic S, Obrenovic R, Djuric D, Jakovljevic V. Effects of atorvastatin and simvastatin on oxidative stress in diet-induced hyperhomocysteinemia in Wistar albino rats: a comparative study. Mol Cell Biochem. 2017 Jun 15. doi: 10.1007/s11010-017-3099-5. [Epub ahead of print]
165. Zivkovic V, Jakovljevic V, Djordjevic D, Vuletic M, Barudzic N, Djuric D. The effects of homocysteine-related compounds on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in isolated rat heart. Mol Cell Biochem. 2012;370(1-2):59-67.

166. Çelik N, Vurmaz A, Kahraman A. Protective effect of quercetin on homocysteine-induced oxidative stress. Nutrition. 2017;33:291-296.
167. Handy DE, Zhang Y, Loscalzo J. Homocysteine downregulates cellular glutathione peroxidase (GPx1) by decreasing translation. J Biol Chem 2005; 280:15518–25.
168. Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL, Allaman M, Knapp HR, Haynes WG. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. Circulation. 1999;100:1161–1168.
169. Nappo F, De Rosa N, Marfella R, De Lucia D, Ingrosso D, Perna AF, Farzati B, Giugliano D. Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. JAMA. 1999;281:2113–2118.
170. Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary MD, Remacle J. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. Mech Ageing Dev 1990;51:283-97.
171. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. Cell Mol Life Sci. 2004;61:192-208.
172. Nagababu E, Chrest FJ and Rifkind JM. Hydrogen peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. Biochim Biophys Acta. 2003;1620:211-7.
173. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. FEBS J. 2008;275:3959-70.
174. Тамара Николић. Ефекти хиперхомоцистеинемије на функцију миокарда, коронарну циркулацију и редокс статус изолованог срца пацова: улога инхибитора хидроксиметил-глутарил коензим-А (HMG-CoA) редуктазе. Докторска дисертација. Факултет медицинских наука Крагујевац, 2015.
175. Akgullu C, Huyut MA, Boyacioglu M, Guleş O, Eryilmaz U, Hekim T, Dogan E, Zencir C, Güngör H. Nebivolol to attenuate the effects of hyper-homocysteinaemia in rats. Atherosclerosis. 2015;240(1):33-9.
176. Lee YC, Martin E, Murad F. Human recombinant soluble guanylyl cyclase: Expression, purification, and regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2000;97:10763–10768.
177. Durante W, Kroll MH, Christodoulides N, et al. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth

muscle cells. Circ Res 1997;80:557–564.

178. Ingi T, Cheng J, Ronnett GV. Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signalling system. Neuron 1996;6:835–842.
179. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1997;37:517–554.
180. Motterlini R, Foresti R, Intaglietta M, et al. NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. Am J Physiol 1996;270:H107–H114.
181. Leffler CW, Nasjletti A, Johnson RA, et al. Contributions of prostacyclin and nitric oxide to carbon monoxide-induced cerebrovascular dilation in piglets. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001;280:H1490–H1495.
182. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. EMBO J 2001;20:6008–6016.
183. Teague B, Asiedu S, Moore PK. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. Br J Pharmacol 2002;137: 139–145.
184. Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. Biochem Biophys Res Commun 1997;237:527–531.
185. Zhao W, Wang R. H2S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002;283:H474–H480.
186. Li J, Liu XJ, Furchgott RF. Blockade of nitric oxide-induced relaxation of rabbit aorta by cysteine and homocysteine. Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao 1997;18:11–20.
187. Li H, Marshall ZM, Whorton AR. Stimulation of cystine uptake by nitric oxide: regulation of endothelial cell glutathione levels. Am J Physiol 1999;276:C803–C811.
188. Jin HF, Du JB, Li XH, Wang YF, Liang YF, Tang CS. Interaction between hydrogen sulfide/cystathionine gamma-lyase and carbon monoxide/heme oxygenase pathways in aortic smooth muscle cells. Acta Pharmacol Sin. 2006 Dec;27(12):1561-6.
189. Udayabanu, M., Kumaran, D., Nair, R.U., Srinivas, P., Bhagat, N., Aneja, R., Katyal, A. Nitric oxide associated with iNOS expression inhibits acetylcholinesterase activity and induces memory impairment during acute hypobaric hypoxia. Brain Res., 2008; 1230, 138–149.

190. Kapur, S., Bedard, S., Marcotte, B., Cote, C.H. & Marette, A. Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. Diabetes, 1997; 46, 1691–1700.
191. Petrov, K. A., Malomouzh, A. I., Kovyazina, I. V., Krejci, E., Nikitashina, A. D., Proskurina, S. E., Zobov, V. V. and Nikolsky, E. E. Regulation of acetylcholinesterase activity by nitric oxide in rat neuromuscular junction via *N*-methyl-D-aspartate receptor activation. Eur J Neurosci, 2013; 37: 181–189.
192. Saldanha C. Human Erythrocyte Acetylcholinesterase in Health and Disease. Molecules 2017; 22: 1499.
193. Willis D, Moore AR, Frederick R, et al. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. Nat Med 1996;2:87–90.
194. Willis D. Expression and modulatory effects of heme oxygenase in acute inflammation in the rat. Inflamm Res 1995;44:S218–S220.
195. Foresti R, Sarathchandra P, Clark JE, et al. Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. Biochem J 1999;339:729–736.
196. Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, et al. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. Circ Res 1999;85:663–671.
197. Foresti R, Goatly H, Green CJ, et al. Role of heme oxygenase-1 in hypoxia-reoxygenation: requirement of substrate heme to promote cardioprotection. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001;281: H1976–H1984.
198. Clark JE, Foresti R, Green CJ, et al. Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. Biochem J 2000;348:615–619.
199. Foresti R, Motterlini R. The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeo-stasis. Free Radic Res 1999;31:459–75.
200. Sammut IA, Foresti R, Clark JE, et al. Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of haeme oxygenase-1. Br J Pharmacol 1998;125:1437–1444.
201. Motterlini R, Green CJ, Foresti R. Regulation of heme oxygenase-1 by redox signals involving nitric oxide. Antioxid Redox Signal 2002;4:615–624.
202. Nauser T, Koppenol WH, Schöneich C. Reversible hydrogen transfer reactions in

thiyl radicals from cysteine and related molecules: absolute kinetics and equilibrium constants determined by pulse radiolysis. J Phys Chem B. 2012 May 10;116(18):5329-41.

203. Boev VM, Nikonorov AA, Perepelkin SV, et al. Effects of hydrogen sulfide containing gas condensate on the hepatic microsomal monooxygenase system. Gigiena Sanitariia 1997;5:5–6.
204. McLaren GW, Macdonald DW, Georgiou C, et al. Leukocyte coping capacity: a novel technique for measuring the stress response in vertebrates. Exp Physiol 2003;88:541–546.
205. Живковић Владимир. Ефекти хомоцистеина и супстанци сродних хомоцистеину на кардиодинамику и коронарни проток изолованог срца пацова: улога гасних трансмитера и оксидационог стреса. Докторска дисертација. Факултет медицинских наука, Крагујевац, 2013.
206. Gao Y, Yao X, Zhang Y, Li W, Kang K, Sun L, Sun X. The protective role of hydrogen sulfide in myocardial ischemia-reperfusion-induced injury in diabetic rats. Int J Cardiol. 2011; 152(2):177-83.
207. Xu X, Zhao W, Lao S, Wilson BS, Erikson JM, Zhang JQ. Effects of exercise and L-arginine on ventricular remodeling and oxidative stress. Med Sci Sports Exerc. 2010;42(2):346-54.
208. Uzun H, Simsek G, Aydin S, Unal E, Karter Y, Yelmen NK, Vehid S, Curgunlu A, Kaya S. Potential effects of L-NAME on alcohol-induced oxidative stress. World J Gastroenterol. 2005;11(4):600-4.
209. Huang P, Shen Z, Yu W, Huang Y, Tang C, Du J, Jin H. Hydrogen Sulfide Inhibits High-Salt Diet-Induced Myocardial Oxidative Stress and Myocardial Hypertrophy in Dahl Rats. Front Pharmacol. 2017;8:128.
210. Hemanth Kumar B, Arun Reddy R, Mahesh Kumar J, Dinesh Kumar B, Diwan PV. Effects of fisetin on hyperhomocysteinemia-induced experimental endothelial dysfunction and vascular dementia. Can J Physiol Pharmacol. 2017;95(1):32-42.
211. Kamat PK, Kalani A, Givvimani S, Sathnur PB, Tyagi SC, Tyagi N. Hydrogen sulfide attenuates neurodegeneration and neurovascular dysfunction induced by intracerebral-administered homocysteine in mice. Neuroscience. 2013;252:302-19.
212. Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A. The role of sulfur-containing amino

acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells, J. Biol. Chem. 1987; 262: 10098–10103.

213. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, Loscalzo J. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen, J. Clin. Invest. 1993; 91: 308–318.
214. Hrncic D, Rasic-Markovic A, Macut D, Susic V, Djuric D, Stanojlovic O. Homocysteine thiolactone-induced seizures in adult rats are aggravated by inhibition of inducible nitric oxide synthase. Hum Exp Toxicol. 2014;33(5):496-503.
215. Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress, FASEB J. 2004; 18: 1165–1167.
216. Guo W, Kan JT, Cheng ZY, Chen JF, Shen YQ, Xu J, Wu D, and Zhu YZ. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator in mitochondria and mitochondria dysfunction. Oxid Med Cell Longev. 2012; 2012: 878052.
217. Kim KM, Pae HO, Zheng M, Park R, Kim YM, Chung HT. Carbon monoxide induces heme oxygenase-1 via activation of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase and inhibits endothelial cell apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. Circ Res. 2007;101(9):919-27.
218. Loscalzo J. The Oxidant Stress of Hyperhomocyst(e)inemia. J. Clin. Invest. 1996; 98: 5–7.
219. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Dec;289(6):H2649-56.
220. Steed MM and Tyagi SC. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia. Antioxid. Redox Signal. 2011; 15: 1927–1943.
221. Zhang X, Li H, Jin H, Ebin Z, Brodsky S, and Goligorsky MS. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. Am J Physiol Renal Physiol 2000; 279: 671–678.
222. Jin L, Caldwell RB, Li-Masters T, and Caldwell RW. Homocysteine induces endothelial dysfunction via inhibitionof arginine transport. J Physiol Pharmacol 2007; 58: 191–206.
223. Stuhlinger MC, Tsao PS, Her J, Kimotot M, Balint RF, and Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway, role of asymmetric dimethylarginine.

Circulation 2001; 104: 2569–2575.

224. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. Life Sci 2004; 75: 639–653.

225. Heydrick SJ, Weiss N, Thomas SR, et al. L-homocysteine and L-homocystine stereospecifically induce endothelial nitric oxide synthase-dependent lipid peroxidation in endothelial cells. Free radical biology & medicine 2004; 36(5):pp. 632-640.

226. Ushio-Fukai M. VEGF signaling through NADPH oxidasederived ROS. Antioxidants and Redox Signaling, 2007; 9: pp. 731–739.

227. Bearden SE, Beard RS Jr, Pfau JC. Extracellular transsulfuration generates hydrogen sulfide from homocysteine and protects endothelium from redox stress. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010 Nov;299(5):H1568-76.

9. БИОГРАФИЈА

Мр Душко Корњача је рођен 13.08.1960. године у Чајничу (Република Српска), где је завршио основну и средњу школу.

Медицински факултет је уписао школске 1981/82 године у Крагујевцу, а дипломирао у Београду фебруара 1987. године.

Специјализацију из Интерне медицине је завршио 2005. године, а субспецијализацију из гастроентерологије и хепатологије 2010. године у Новом Саду.

У периоду од 1987-2007 године је радио у ДЗ "Васа Пелагић" у Чајничу, док је у периоду од 2007 – 2009 радио у Специјалној болници за интерне болести "Вита" у Новом Саду.

Од 2009. године је запослен у ФИП–комерцу д.о.о Београд, Пословница Нови Сад.

Говори руски и енглески језик, познаје рад на рачунарима.

10. БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Kornjača Duško**, Živković Vladimir, Krstić Danijela, Čolović Mirjana, Đurić Marko, Stanković Sanja, Mutavdžin Slavica, Jakovljević Vladimir, Đurić Dragan. The effects of acute hyperhomocysteinemia induced by DL-homocysteine or DL-homocysteine thiolactone on serum biochemical parameters, plasma antioxidant enzyme and cardiac acetylcholinesterase activities in the rat. Arch Biol Sci 2017, OnLine-First (00):41-41. DOI: 10.2298/ABS170731041K.

2. **Dusko Kornjaca**, Vladimir Zivkovic, Nevena Barudzic, Vladimir Jakovljevic, Dragan Djuric. The effects of vibroacoustically induced microvibrations on arterial blood pressure and oxidative stress in rats. Ser J Exp Clin Res 2014; 15 (2): 83-88.

3. **Dusko Kornjaca**, Vladimir Jakovljevic, Stefan Zivkovic, Marko Djuric, Nela Puskas, Dragan Djuric. The effects of acute vibroacoustic microvibrations on the rat heart rate, rhythm and structure. Ser J Exp Clin Res 2014; 15 (4): 191-196.

ПРИЛОГ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број – РБ:
Идентификациони број – ИБР:
Тип документације – ТД: Монографска публикација
Тип записа – ТЗ: Текстуални штампани материјал
Врста рада – ВР: Докторска дисертација
Аутор – АУ: Душко Корњача
Ментор/коментор – МН: доц. др Владимир Живковић
Наслов рада – НР: Ефекти хиперхомоцистеинемије на параметре оксидационог стреса и активност ензима ацетилхолинестеразе у плазми и срцу пацова: улога гасних трансмитера (NO, H_2S и CO)
Језик публикације – ЈП: српски/ћирилица
Језик извода – ЈИ: српски/енглески
Земља публиковања – ЗП: Република Србија
Уже географско подручје – УГП: Централна Србија
Година – ГО: 2018. година
Издавач – ИЗ: Ауторски репринт
Место и адреса – МС: 34 000 Крагујевац, Светозара Марковића 69, Република Србија
Физичи опис рада – ФО: 153 стране, 8 табела, 24 графикона
Научна област – УДК: Медицина
Научна дисциплина – ДИ: Физиологија
Предметна одредница/кључне речи – ПО: ацетилхолинестераза, гасотрансмитери, срце, пацов, хомоцистеин
Чува се – ЧУ: У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Важна напомена – ВН:

Извод – ИД:

Увод: С обзиром на доказано повећање активности ацетилхолинестеразе (AchE) унутар централног нервног система у условима хиперхомоцистеинемије, поставља се претпоставка да ли хомоцистеин може и у срчаном мишићу да регулише активност овог ензима. Повезаност метаболизма хомоцистеина, слободних радикала и гасотрансмитера у оквиру кардиоваскуларног система је још веома слабо истражена. Такође, врло је интересантно да у доступној литератури нема података о активности и евентуалној улози AchE у функцији срца, поготово у условима хиперхомоцистеинемије.

Циљ: Циљ овог истраживања је било испитивање ефеката акутне (индуковане ДЛ-хомоцистеином и ДЛ-хомоцистеин тиолактоном) и субхроничне хиперхомоцистеинемије (индуковане ДЛ-хомоцистеином) на концентрацију прооксидативних и активност антиоксидативних маркера у плазми пацова, као и на активност ензима ацетилхолинестеразе у ткиву миокарда пацова.

Материјал и методе: Истраживање је дизајнирано као експериментална студија спроведена *in vitro* и *ex vivo*. У циљу изазивања акутне хиперхомоцистеинемије експерименталним групама је интраперитонеално администрирана једна доза ДЛ-хомоцистеина (8 mmol/kg тм) и ДЛ-хомоцистеин тиолактона (8 mmol/kg тм). Шездесет минута након апликације, животиње су се жртвовале ради прикупљања узорака крви (за мерење маркера оксидационог стреса) и узимања ткива срца у чијем хомогенату се одређивала активност AchE. Субхронична хиперхомоцистеинемија је изазвана апликацијом ДЛ-хомоцистеина (0.45 μmol/g тм. s.c., два пута дневно у интервалу од 8 сати, у периоду од четрнаест дана).

Резултати: Акутна и хронична хиперхомоцистеинемија су повезане са снижењем активности ацетилхолинестеразе у срцу пацова. Ови налази сугеришу да хомоцистеин путем дејства на AchE може да мења холинергичку контролу срчане функције односно да инхибицијом разградње ацетилхолина потенцира снажнији и дуготрајнији негативни холинергички ефекат на срце. Блокада продукције NO и CO је била повезана са снижењем активности ацетилхолинестеразе. Ова сазнања индикују да NO и CO сигнални путеви могу да имају улогу у модулацији активности овог ензима. На основу наших налаза уочава се да је овај ефекат био најизраженији у случају NO сигнализације. Редукција срчане AchE активности под утицајем хомоцистеина прелази у значајан пораст приликом апликације инхибитора синтезе гасотрансмитера. На овај начин потенцирање холинергичких дејстава хомоцистеина у срцу не само да престаје у условима одсуства деловања гасотрансмитера, већ постаје смањено захваљујући појачаној разградњи ацетилхолина.

Закључак: Добијени резултати дају оригиналан и битан допринос у разумевању улоге ацетилхолинестеразе у функцији миокарда у условима хиперхомоцистеинемије, као и у условима смањења доступности појединих гасотрансмитера, чиме се отвара низ могућности за испитивање шире клиничке примене, имајући у виду значај хомоцистеина у настанку патолошких ентитета кардиоваскуларног система.

Кључне речи: ацетилхолинестераза, гасотрансмитери, срце, пацов, хомоцистеин

Датум прихватања теме од стране ННВ – ДП: 24.12.2014.

Датум одбране – ДО:

Чланови комисије – КО:

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник;
2. **Проф. др Драган Ђурић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Физиологија, члан;
3. **Доц. др Иван Срејовић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан.

KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number – ANO:
Identification number – INO:
Documentation type – DT: Monographic publication
Type of record – TR: Textual printed material
Contents code – CC: Ph. D. Thesis
Author – AU: Duško Kornjača
Menthor/co-mentor – MN: Assistant professor Vladimir Živković, M.D. Ph.D.
Title – TI: Effects of hyperhomocysteinemia on parameters of oxidative stress and activity acetylcholinesterase enzyme in plasma and heart rats: the role of gasotransmitters (NO, H_2S and CO)
Language of text – LT: Serbian / Cyrillic
Language of abstract: Serbian / English
Country of publication – CP: Republic of Serbia
Locality of publication – LP: Central Serbia
Publication year – PY: 2018
Publisher – PU: Author reprint
Publication place – PP: 34 000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Republic of Serbia
Physical description – PD: 153 pages, 8 tables, 24 charts
Scientific field – SF: Medicine
Scientific discipline – SD: Physiology
Subject/key words – SKW: acetylcholinesterase, gasotransmitters, heart, rat, homocysteine
UDC:
Holding data: Library of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Republic of Serbia
Note – N:

Abstract – AB:

Introduction: Considering the proven increase in activity of acetylcholinesterase (AchE) within the central nervous system under conditions of hyperchomocysteinemia, it is assumed that homocysteine can also regulate the activity of this enzyme in the heart muscle. The association of metabolism of homocysteine, free radicals and gasotransmitters within the cardiovascular system is still very poorly investigated. It is also very interesting that in the available literature there is no information regarding the activity and the possible role of AchE in the function of the heart, especially in the conditions of hyperhomocysteinaemia.

Aim: The aim of this study was to investigate the effects of acute (induced by DL-homocysteine and DL-homocysteine thiolactone) and subchronic hyperhomocysteinemia (induced by DL-homocysteine) on the concentration of prooxidative and activity of antioxidative markers in rat plasma as well as the activity of acetylcholinesterase enzymes in myocardial tissue rats.

Material and methods: The research was designed as an experimental study conducted *in vitro* and *ex vivo*. In order to induce acute hyperchomocysteinemia to experimental groups, one dose of DL-homocysteine (8 mmol / kg tm) and DL-homocysteine thiolactone (8 mmol / kg tm) was administered intraperitoneally. Sixty minutes after application, animals were sacrificed to collect blood samples (for measuring oxidative stress markers) and heart tissue was taken in whose homogenate the AchE activity was determined. Subchronic hyperchomocysteinemia was caused by the application of DL-homocysteine (0.45 μmol / g of tm.s.c., twice daily for an interval of 8 hours, for a period of fourteen days).

Results: Acute and chronic hyperchomocysteinemia were associated with a decrease in acetylcholinesterase activity in the heart of rats. These findings suggest that homocysteine can alter the cholinergic control of the cardiac function via the action on AchE, that is, by inhibiting the decomposition of acetylcholine, a stronger and longer-lasting negative cholinergic effect on the heart. Blockage of NO and CO production was associated with a decrease in acetylcholinesterase activity. These findings indicate that NO and CO signal pathways can play a role in modulation of the activity of this enzyme. Based on our findings, it can be noted that this effect was most pronounced in the case of NO signaling. Reduction of cardiac AchE activity under the influence of homocysteine transitions to a significant increase after application of gasotransmitter synthesis inhibitors. On this way, the potentiation of cholinergic effects of homocysteine in the heart not only stops under the conditions of absence of the action of the gasotransmitter, but becomes reduced due to the intensified degradation of acetylcholine.

Conclusions: The obtained results give a novel and important contribution to understanding the role of acetylcholinesterase in the function of myocardium in the conditions of hyperhomocysteinemia, as well as in the conditions of reducing the availability of specific gasotransmitters, thus opening up a range of possibilities for testing wider clinical application, bearing in mind the significance of homocysteine in the onset of pathological entities of the cardiovascular system.

Key words: acetylcholinesterase, gasotransmitters, heart, rat, homocysteine.

Accepted by the Scientic Board on – ASB: 24th December 2014.

Defended on – DE:

Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) – DB:

1. **Full Professor Vladimir Jakovljevic**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific field Physiology, chairman;
2. **Full Professor Dragan Djuric**, M.D, Ph.D, Medical faculty, University of Belgrade, scientific field Physiology, member;
3. **Assistant Professor Ivan Srejovic**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific field Physiology, member.

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Душко Корњача, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Ефекти хиперхомоцистеинемије на параметре оксидационог стреса и активност ензима ацетилхолинестеразе у плазми и срцу пацова: улога гасних трансмитера (NO, H2S и CO)

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 24.1.2018. године,

потпис аутора

Образац 2

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Душко Корњача,

☑ дозвољавам

☐ не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Ефекти хиперхомоцистеинемије на параметре оксидационог стреса и активност ензима ацетилхолинестеразе у плазми и срцу пацова: улога гасних трансмитера (NO, H2S и CO)

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

☑ дозвољавам

☐ не дозвољавам[1]

[1] Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

1) Ауторство

2) Ауторство - делити под истим условима

3) Ауторство - без прерада

4) Ауторство - некомерцијално

5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима

6) Ауторство - некомерцијално - без прерада[2]

У Крагујевцу, 24.1.2018. године,

потпис аутора

[2] Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: http://creativecommons.org.rs/

Archives of Biological Sciences 2017 OnLine-First Issue 00, Pages: 41-41
https://doi.org/10.2298/ABS170731041K
Full text (590 KB)

The effects of acute hyperhomocysteinemia induced by DL-homocysteine or DL-homocysteine thiolactone on serum biochemical parameters, plasma antioxidant enzyme and cardiac acetylcholinesterase activities in the rat

Kornjača Duško, Živković Vladimir, Krstić Danijela, Čolović Mirjana, Đurić Marko, Stanković Sanja, Mutavdžin Slavica, Jakovljević Vladimir, Đurić Dragan

The aim of this study was to assess the effects of DL-homocysteine (DL-Hcy) and DL-homocysteine thiolactone (DL-Hcy TLHC) on selected serum biochemical parameters, markers of oxidative stress and the activities of antioxidant enzymes (catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD)) in the plasma, as well as on acetylcholinesterase (AChE) activity in the cardiac tissue homogenate in the rat. Male Wistar rats were divided into three groups as follows: control group (1 mL 0.9% NaCl, intraperitoneal (i.p.) injection), DL-Hcy group (8 mmol/kg body mass (b.m.), i.p.) or DL-Hcy TLHC group (8 mmol/kg b.m., i.p.). One hour after administration, the rats were euthanized, whole blood was collected for biochemical analysis, and the heart was excised. Following the i.p. administration of DL-Hcy and DL-Hcy TLHC, the activities of antioxidant enzymes were mostly significantly increased, while plasma malondialdehyde (MDA) was decreased. Administration of DL-Hcy and DL-Hcy TLHC significantly inhibited AChE activity in rat cardiac tissue. Our findings suggest that DL-Hcy and DL-Hcy TLHC exerted prooxidant effects; however, the decrease in MDA points to an inverse response to the increase in antioxidant enzyme activities. While both substances inhibited AChE activity in rat cardiac tissue, DL-Hcy TLHC induced stronger effects than DL-Hcy. [Project of the Serbian Ministry of Education, Science and Technological Development, Grant no. 175043]

Keywords: acetylcholinesterase, antioxidant enzymes, DL-homocysteine, DL-homocysteine thiolactone, rat

The effects of acute hyperhomocysteinemia induced by DL-homocysteine or DL-homocysteine thiolactone on serum biochemical parameters, plasma antioxidant enzyme and cardiac acetylcholinesterase activities in the rat

Duško Kornjača[1], Vladimir Živković[2], Danijela Krstić[3], Mirjana Čolović[4], Marko Đurić[5], Sanja Stanković[6], Slavica Mutavdžin[7], Vladimir Jakovljević[2,8] and Dragan Đurić[7,*]

[1]*Independent Medical Practice,* Novi Sad, Serbia
[2]*University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Physiology*, Serbia
[3]*Institute of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Belgrade*, Serbia
[4]*Department of Physical Chemistry, Vinča Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade*, Serbia
[5]*Department of Anesthesiology, Reanimation and Intensive Care Medicine, University Clinical Hospital Center "Dr. Dragiša Mišović – Dedinje"*, Belgrade, Serbia
[6]*Centre of Medical Biochemistry, Clinical Centre of Serbia,* Belgrade, Serbia
[7]*Institute of Medical Physiology "Richard Burian", Faculty of Medicine, University of Belgrade,* Serbia
[8]*IM Sechenov First Moscow State Medical University, Department of Human Pathology,* Moscow, Russia

***Corresponding author:** drdjuric@eunet.rs; dr_djuric@yahoo.com

Received: July 31; **Revised:** October 23, 2017; **Accepted:** October 23, 2017

Abstract: The aim of this study was to assess the effects of DL-homocysteine (DL-Hcy) and DL-homocysteine thiolactone (DL-Hcy TLHC) on selected serum biochemical parameters, markers of oxidative stress and the activities of antioxidant enzymes (catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD)) in the plasma, as well as on acetylcholinesterase (AChE) activity in the cardiac tissue homogenate in the rat. Male Wistar rats were divided into three groups as follows: control group (1 mL 0.9% NaCl, intraperitoneal (i.p.) injection), DL-Hcy group (8 mmol/kg body mass (b.m.), i.p.) or DL-Hcy TLHC group (8 mmol/kg b.m., i.p.). One hour after administration, the rats were euthanized, whole blood was collected for biochemical analysis, and the heart was excised. Following the i.p. administration of DL-Hcy and DL-Hcy TLHC, the activities of antioxidant enzymes were mostly significantly increased, while plasma malondialdehyde (MDA) was decreased. Administration of DL-Hcy and DL-Hcy TLHC significantly inhibited AChE activity in rat cardiac tissue. Our findings suggest that DL-Hcy and DL-Hcy TLHC exerted prooxidant effects; however, the decrease in MDA points to an inverse response to the increase in antioxidant enzyme activities. While both substances inhibited AChE activity in rat cardiac tissue, DL-Hcy TLHC induced stronger effects than DL-Hcy.

Key words: acetylcholinesterase; antioxidant enzymes; DL-homocysteine; DL-homocysteine thiolactone; rat

Abbreviations: ACh – acetylcholine; AChE – acetylcholinesterase; Alb – albumin; ALT – alanine aminotransferase; AMY – alfa amylase; AST – aspartate aminotransferase; CAT – catalase; CHD – coronary heart disease; Chol – cholesterol; CSE – cystathionine gamma lyase; Crea – creatinine; DL-PAG – DL-propargylglycine; ECL – electrochemiluminescence immunoassay system; eNOS – endothelial nitric oxide synthase; Fibr – fibrinogen; Gluc – glucose; GPx – glutathione peroxidase; GSH – glutathione; Hcy – homocysteine; HHcy – hyperhomocysteinemia; HDL – high density cholesterol; HO-1

– heme oxygenase-1; hsTnT – high sensitivity troponin T; LDH – lactate dehydrogenase; LDL – low density cholesterol; L-NAME – Nω-nitro-L-arginine methyl ester; MDA – malondialdehyde; SOD – superoxide dismutase; TGL – triglycerides; TP – total protein; Urca – uric acid; VWF Act – Von Willebrand factor activity; ZnPPR IX – zinc protoporphyrin IX

INTRODUCTION

Homocysteine (Hcy) is an endogenous sulfhydryl-containing amino acid that is an intermediate product in the normal biosynthesis of the amino acids methionine and cysteine [1]. Deficiency of the enzymes and/or vitamins that are involved in the homocysteine metabolic pathway leads to its increased levels in the plasma, referred to as hyperhomocysteinemia (HHcy) [2,3]. Data suggests that metabolic conversion of Hcy to the thioester Hcy-thiolactone contributes to Hcy pathobiology [4].

Literature findings indicate that there is a clear correlation between total serum Hcy and the incidence of cardiovascular disease and its complications, such as heart attacks and strokes, thus promoting Hcy as a new and independent risk factor for these diseases [5,6]. HHcy leads to endothelial dysfunction, which may further promote the proliferation of vascular smooth muscle cells [7] and increase collagen synthesis in vascular smooth muscle cells [8]. There is evidence that HHcy is associated with increased ROS formation, including the superoxide anion radical (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) [9], thereby leading to oxidative stress and cell damage [10]. The main antioxidant enzymes responsible for controlling oxygen free radicals are SOD, CAT, and glutathione-dependent enzymes, including GPx, GR and GST [10]. While it has been found that HHcy may impair the glutathione-related antioxidant defense system [11,12], data about its effect on SOD activity are still controversial.

While some studies showed that HHcy decreased erythrocyte SOD activity in patients with cardiovascular disease (CVD) [12,13], others have established a positive relationship between SOD activity and Hcy levels in patients with homocystinuria [14]. Acetylcholinesterase (AChE) is the serum protease that terminates neurotransmission at cholinergic synapses by splitting the acetylcholine into choline and acetate, and it is predominantly distributed in different brain regions [15]. Interestingly, elevated homocysteine levels increase AChE activity in the central nervous system [15,16], while homocysteine thiolactone slowly and irreversibly inhibits it [17]. Recent investigations have proved the presence of AChE activity in the heart [18].

Taking into account that the molecular mechanisms of Hcy-induced cardiac effects are still poorly understood, this study aimed to examine the effect of DL-homocysteine and its thiolactone metabolite on serum biochemical parameters, markers of oxidative stress, the activities of antioxidant enzymes and cardiac AChE activity in the rat.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All chemicals were purchased from the Sigma Chemical Co. (USA).

Experimental animals

Male Wistar albino rats (n=36, 12 in each experimental group; 10 weeks old, body mass 250±30 g) were used. The rats were housed under strictly controlled conditions of air temperature (22±1°C), relative humidity (50%) and a 12 h light/dark cycle (with the light period commencing at 9 am), with free access to water and standard food. All experimental procedures were performed in accordance with the EU Directive for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes 86/609/EES.

Experimental protocol

To produce acute HHcy, DL-homocysteine (DL-Hcy) and DL-homocysteine thiolactone (DL-Hcy TLHC) were administered i.p. in a single dose. Rats were divided into three groups as follows: control group (1 mL 0.9% NaCl, intraperitoneal (i.p.) injection), DL-Hcy group (8 mmol/kg b.m., i.p.) or DL-Hcy TLHC group (8 mmol/kg b.m., i.p.). One hour after administration, the rats were euthanized, whole blood was collected for biochemical analysis, and the heart was excised. Saline and both Hcy compounds were administered in the same volume (1 mL). Sixty min after application, the animals were killed using a rat guillotine, blood samples were collected, and the heart was removed. After collection, the samples were kept at room temperature for 15 min, centrifuged for 15 min at 2000 x g and analyzed.

Serum biochemical parameters

The following serum biochemical parameters: Alb, ALT, AMY, AST, Chol, C, Fibr, Gluc, HDL, Hcy, hsTnT, LDH, LDL, TGL, TP, Urca, Urea, VWF Act, were analyzed using spectrophotometry and commercial kits (Siemens Healthcare Diagnostics Ltd. Frimley, Camberley, UK) on an automatic biochemical analyzer (Dimension Xpand, Siemens). An immunoturbidimetric commercial assay (Siemens Healthcare GmbH, Marburg, Germany) was used for the determination of fibrinogen and von Willebrand factor activity on a BCS XP coagulation analyzer (Siemens Healthcare GmbH, Marburg, Germany). Serum homocysteine was measured by an automated electrochemiluminescence immunoassay system ADVIA Centaur XP system (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germany).

Determination of lipid peroxidation products

The MDA content in plasma was determined by the TBARS assay according to the standard procedure [19]. The values of MDA content (nmol of MDA/mL plasma) were determined on the basis of absorbance values and molar absorption coefficient of the malondialdehyde-thiobarbituric acid complex.

Determination of CAT activity

CAT activity was estimated by measuring the degradation of H_2O_2 [20]. The rate of decomposition of H_2O_2 by CAT is measured spectrometrically at 230 nm. CAT activity was expressed as U/mL of plasma, with 1 U of enzyme activity defined as 1 µL of spent H_2O_2/min.

Determination of SOD

SOD activity was measured according to the method of Misra and Fridovich [21], with 1 U of SOD defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of the epinephrine oxidation by 50%; enzyme activity was expressed as U/mL of plasma.

Determination of GPx activity

GPx activity was estimated essentially as described [22] and expressed as ΔA/min/mL of plasma.

Determination of AChE activity

AChE activity was determined in cardiac tissue homogenates. Heart tissue was homogenized (20 mg of tissue per 1 mL of phosphate buffer (pH 8.0, 0.1 M)) and centrifuged for 15 min at 10000 x g. The specific activity of AChE in the heart homogenate was determined *in vitro* by the method of Ellman [23].

Statistics

Statistical analysis of experimental data included the following basic descriptive statistics using the mean value (X)±standard error mean (SEM). Since the sample data do not have a normal distribution, in order to determine statistically significant differences between the groups, the Kruskal-Wallis H test (the nonparametric alternative to the one-way ANOVA) was used, as well as multiple comparisons test and Pearson's chi-square test. $P<0.05$ was considered to be

significant. A database analysis of the results was performed using the software package SPSS 22th (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

Plasma biochemical parameters

The plasma values of biochemical parameters are expressed in standard units and are presented in Table 1. It is important to note that the concentrations of Hcy in both experimental groups were >65 mmol/L. The glucose values were higher in DL-Hcy TLHC in comparison to both the control ($p<0.05$) and DL-Hcy groups ($p<0.05$). Total protein values were lower in the DL-Hcy group ($p<0.01$) when compared to the control and DL-Hcy TLHC groups ($p<0.05$). Alb, ALT and Fibr values were lower in both experimental groups as compared to the control ($p<0.01$), while the DL-Hcy TLHC group had higher values of Alb than the DL-Hcy group ($p<0.05$). Chol and HDL values were higher in the DL-Hcy TLHC group in comparison to the control and DL-Hcy group ($p<0.01$, $p<0.05$). LDL values were higher in the DL TLHC group when compared to the control ($p<0.01$). Compared to the control group, serum AMY values were higher in both experimental groups ($p<0.01$) groups while the HDL values were higher in both DL-Hcy groups ($p<0.05$).

Index of lipid peroxidation (MDA)

Administration of DL-Hcy ($p<0.01$) and DL-Hcy TLHC ($p<0.05$) induced a statistically significant decrease in MDA as compared to the control group (Fig. 1A).

CAT, GPx and SOD activities

Administration of DL-Hcy TLHC induced a statistically significant increase in CAT activity in the plasma as compared to the control group ($p<0.01$). Furthermore, there was significant increase of CAT activity after administration DL-Hcy TLHC when compared to the administration of DL-Hcy ($p<0.05$) (Fig. 1B).

The same trend in GPx activity was observed after the administration of DL-Hcy and DL-Hcy TLHC. Administration of DL-Hcy TLHC induced a statistically significant increase in GPx activity as compared to the control ($p<0.01$). There was highly significant increase in GPx activity after DL-Hcy TLHC administration when compared to DL-Hcy ($p<0.01$) (Fig. 1C).

After DL-Hcy administration, SOD activity was statistically increased ($p<0.01$). DL-Hcy TLHC administration decreased SOD activity without statistical significance. A highly significant increase in SOD activity was noted after DL-Hcy administration in comparison to DL-Hcy TLHC administration ($p<0.01$) (Fig. 1D).

AChE activity

AChE activity was significantly decreased after the administration of DL-Hcy ($p<0.01$) and DL-Hcy TLHC ($p<0.01$) as compared to the control (Fig. 2).

DISCUSSION

Our first objective was to investigate the influence of acute HHcy on different serum biochemical parameters in order to assess the systemic response to an DL-Hcy load. Our results showed that an acute rise in DL-Hcy and its thiolactone metabolite did not affect the concentrations of most routinely examined biochemical markers (Table 1), the only exception being an increase in total cholesterol concentrations and its HDL and LDL fractions in rats treated with DL-Hcy TLHC. The data referring to the effect of increased Hcy on the lipid profile are debatable. A previous study of rats that received DL-Hcy TLHC for 30 days (1 g/kg body weight/day) showed elevated serum cholesterol and triglycerides [24], with which our results

agree. Interaction between Hcy and lipids is poorly understood, especially with regard to the activity of the enzyme paraoxonase. Nevertheless, it has been proposed that DL-Hcy induces endoplasmic reticulum stress and activates sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs), which could increase the expression of genes responsible for cholesterol/triglyceride biosynthesis [25].

The kidneys are important in the removal of Hcy, and they could be affected by elevated plasma DL-Hcy levels. Although a recent investigation on mice suggests that persistently increased levels of DL-Hcy induce extracellular matrix remodeling and renal fibrosis [26], the parameters of renal function we examined (Urea, Crea and Urca) were not changed following the acute increase in DL-Hcy.

The liver possesses the highest catabolic capacity for DL-Hcy, and increases in DL-Hcy or methionine levels can lead to liver oxidative/nitrosative stress [27]. Results linked with hepatocellular damage (AST and ALT) showed that HHcy is not linked to hepatocellular damage; however, the observed lower levels of serum Alb and Fibr in both experimental groups indicate that there is an initial impairment of liver function. Disturbed fibrinogen levels may occur due to an established process of homocysteine vs proteins interactions. Recent studies have demonstrated that treatment with methionine for 8 weeks (100 mg/kg) led to liver dysfunction through increased ROS production [28].

The observed alterations in serum glucose and AMY concentrations in acute HHcy could be linked with pancreatic dysfunction. Also, the higher glucose concentration in the DL-Hcy TLHC group could be the result of insulin resistance. A previous study on rats has shown that HHcy was associated with a decrease in the glucose:insulin ratio and an increase in the insulin resistance index [29]. It was also found that a 2-week treatment with DL-Hcy decreased the cerebral expression of GLUT-1 and produced a concomitant increase in the percentage of damaged cerebral vessels in rats [30].

In addition, we observed increased levels of hsTnT (very close to statistical significance) and LDH, as indicators of cardiac and brain damage. The limited metabolic capacity for DL-Hcy in the cardiovascular system might be linked to injury of the cardiovascular system induced by Hcy.

Our study showed that both DL-Hcy and DL-Hcy TLHC decreased MDA, while there was no significant difference between these experimental groups and its metabolite. These results are not in agreement with the results of other studies where it was shown that acute HHcy increased lipid peroxidation in rats [11]. Additionally, it was shown [9] that chronic DL-Hcy administration also promoted oxidative damage by lipid peroxidation [31]. However, we did not note changes in the index of lipid peroxidation in the isolated rat heart treated with three isoforms of 10 μM homocysteine (DL-Hcy, DL-Hcy TLHC and L-Hcy TLHC) [32]. The discrepancy between our results and the mentioned investigations may be due to the acute application of substances and the resulting lack of time for achieving their negative effects on oxidative stress markers.

Having in mind that GPx-1 may be a key target of the deleterious actions of DL-Hcy [33], it was important to attempt to reveal the complex relationship between HHcy and the activity of this enzyme. We showed that the basic form of DL-Hcy did not significantly affect GPx activity, while DL-Hcy TLHC induced an increase in the activity of this enzyme. One possible explanation for the rise in GPx activity could be the chemical reactivity of the toxic thiolactone metabolite, which possesses the ability to cause prominent activation of the glutathione antioxidant system [34]. In contrast, other investigations found that in acute HHcy, GPx activity

was decreased in a similar experimental model (0.6 μmol DL-Hcy/g body weight) [11]. Nevertheless, the authors used a much lower concentration of DL-Hcy, which may be not have been enough to mobilize this part of the defense system.

On the other hand, we observed completely opposite results in the case of SOD activity. Namely, the application of DL-Hcy led to a significant increase in SOD, while DL-Hcy-TLHC did not change it. Literature data referring to the DL-Hcy-SOD relation are controversial. Previous studies in rats have shown that 3 weeks of DL-Hcy administration decreased SOD levels in the plasma [9,31]. However, although the time under HHcy was prolonged, its concentration was more than 1000 times lower, which may be the reason for the difference to our investigation. In addition, other investigations found that patients with significantly elevated DL-Hcy have elevated SOD levels [14]. Based on the abovementioned, it would seem that concentration determines the direction of DL-Hcy toward SOD, i.e. in mild HHcy, SOD is decreased while in prominent HHcy the activity of this enzyme is strongly activated.

Unlike SOD, CAT values showed a different dynamic. Thus, only the thiolactone form induced a significant increase in plasma CAT activity. Recent investigations on animal models also observed increased CAT activity 15 min after acute DL-Hcy administration, suggesting that the oxidative status of rats was altered [11]. Taking into consideration the increased activities of all antioxidant enzymes, we suggested that DL-Hcy and DL-Hcy TLHC have prooxidant effects. However, the decrease in MDA levels during the same period could mean that the rise in antioxidant activity was inversed. In contrast, chronic administration of DL-Hcy can decrease CAT levels in the plasma, heart and aorta, which are accompanied by histological changes [9]. This finding indicates that, besides changed concentrations, the duration of HHcy can also contribute to the effects of DL-Hcy on antioxidative enzyme activity. The potential mechanisms of DL-Hcy-induced changes in antioxidant defense enzymes probably include different interactions of ROS and DL-Hcy [9].

As previously described [17], it has been assumed that the harmful effects of elevated homocysteine could in part be due to its actions on cholinesterases. In the available literature, there is almost no information concerning the effects of DL-Hcy on AChE activity in the heart. According to the presented results, both DL-Hcy and DL-Hcy TLHC decreased AChE activity in cardiac tissue homogenates (Fig. 2). However, the thiolactone form induced a more prominent decrease in AChE activity, revealing its more deleterious influence on cardiac tissue than Hcy itself. Investigations on human subjects also found that thiolactone slowly and irreversibly inhibited the activity of AChE in plasma [17]. Interestingly, in a recent paper [18] it was suggested that increased cholinergic tone in the heart caused by cholinesterase inhibitors has a positive effect on some cardiovascular disorders such as heart failure.

CONCLUSION

The results of the present study suggest that acute application of different forms of DL-Hcy can elicit responses in different organs. Following acute i.p. administration of DL-Hcy or DL-Hcy TLHC, the activities of antioxidant enzymes in the plasma were significantly increased. Our findings demonstrate that these amino acids have prooxidant effects. In addition, the obtained results were dependent on the form of acutely applied DL-Hcy.

Acknowledgments: This work was supported by Grant No.175043 from the Ministry of Education, Science and Technical Development of the Republic of Serbia.

Author's contribution: Duško Kornjača performed the experiments and the statistical analysis, interpreted the data, analyzed the results and prepared the manuscript; Vladimir Živković performed the statistical analysis, interpreted the data, analyzed the results and prepared the manuscript; Danijela Krstić contributed to the study design, performed the biochemical analysis and interpreted the data; Mirjana Čolović contributed to the study design, performed the biochemical analysis and interpreted the data; Marko Đurić performed the experiments; Sanja Stanković performed the biochemical analysis; Slavica Mutavdžin performed the experiments and the statistical analysis, provided the literature review and prepared the graphics; Vladimir Jakovljević contributed to the study design, performed the statistical analysis, interpreted the data, analyzed the results and prepared the manuscript; Dragan Đurić contributed to the study design, perform the experiments, performed the biochemical and statistical analysis, interpreted the data, analyzed the results and prepared the manuscript.

Conflict of interest disclosure: All authors disclose no actual or potential conflicts of interest, including any financial, personal, or other relationships with people or organizations.

REFERENCES

1. Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. Nutr J. 2015;14:6.
2. Malinowska J, Kolodziejczyk J, Olas B. The disturbance of hemostasis induced by hyperhomocysteinemia; the role of antioxidants. Acta Biochim Pol. 2012;59(2):185-94.
3. Shenov V, Mehendale V, Prabhu K, Shetty R, Rao P. Correlation of serum homocysteine levels with the severity of coronary artery disease. Indian J Clin Biochem. 2014;29(3):339-44.
4. Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. J Physiol Pharmacol. 2008;59(9):155-67.
5. Schaffer A, Verdoia M, Cassetti E, Marino P, Suryapranata H, De Luca G. Novara Atherosclerosis Study Group (NAS). Relationship between homocysteine and coronary artery disease. Results from a large prospective cohort study. Thromb Res. 2014;134(2):288-93.
6. Baszczuk A, Kopczyński Z, Thielemann A. Endothelial dysfunction in patients with primary hypertension and hyperhomocysteinemia. Postepy Hig Med Dosw. 2014;68:91-100.
7. Chen C, Halkos ME, Surowiec SM, Conklin BS, Lin PH, Lumsden AB. Effects of homocysteine on smooth muscle cell proliferation in both cell culture and artery perfusion culture models. J Surg Res. 2000;88(1):26-33.
8. Toohey JI. Homocysteine toxicity in connective tissue: theories, old and new. Connect Tissue Res. 2008;49(2):57-61.
9. Derouiche F, Bôle-Feysot C, Naïmi D, Coëffier M. Hyperhomocysteinemia-induced oxidative stress differentially alters proteasome composition and activities in heart and aorta. Biochem Biophys Res Commun. 2014;452(3):740-5.
10. Liu HH, Shih TS, Huang HR, Huang SC, Lee LH, Huang YC. Plasma homocysteine is associated with increased oxidative stress and antioxidant enzyme activity in welders. Sci World J. 2013;e370487.
11. da Cunha AA, Scherer E, da Cunha MJ, Schmitz F, Machado FR, Lima DD, Delwing D, Wyse AT. Acute hyperhomocysteinemia alters the coagulation system and oxidative status in the blood of rats. Mol Cell Biochem. 2012;360(1-2):205-14.
12. Kerkeni M, Added F, Ben Farhat M, Miled A, Trivin F, Maaroufi K. Hyperhomocysteinaemia and parameters of antioxidative defence in Tunisian patients with coronary heart disease. Ann Clin Biochem. 2008;45(2):193-8.
13. Matté C, Mackedanz V, Stefanello FM, Scherer EB, Andreazza AC, Zanotto C, Moro AM, Garcia SC, Gonçalves CA, Erdtmann B, Salvador M, Wyse AT. Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid. Neurochem Int. 2009;54(1):7-13.
14. Wilcken DE, Wang XL, Adachi T, Hara H, Duarte N, Green K, Wilcken B. Relationship between homocysteine and superoxide dismutase in homocystinuria: possible relevance to cardiovascular risk. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20(5):1199-202.
15. Hrnčić D, Rašić-Marković A, Stojković T, Velimirović M, Puškaš N, Obrenović R, Macut D, Sušić V, Jakovljević V, Djuric D, Petronijević N, Stanojlović O. Hyperhomocysteinemia induced by methionine dietary nutritional overload modulates acetylcholinesterase activity in the rat brain. Mol Cell Biochem. 2014;396(1-2):99-105.

16. Scherer EB, Loureiro SO, Vuaden FC, da Cunha AA, Schmitz F, Kolling J, Savio LE, Bogo MR, Bonan CD, Netto CA, Wyse AT. Mild hyperhomocysteinemia increases brain acetylcholinesterase and proinflammatory cytokine levels in different tissues. Mol Neurobiol. 2014;50(2):589-96.
17. Darvesh S, Walsh R, Martin E. Homocysteine thiolactone and human cholinesterases. Cell Mol Neurobiol. 2007;27(1):33-48.
18. Kučera M, Hrabovská A. Cholinergic system of the heart. Ceska Slov Farm. 2015;64(6):254-63.
19. Aruoma OI, Halliwell B, Laughton MJ, Quinlan GJ, Gutteridge JMC. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron (II)- iron (III) complex. Biochem J. 1989;258:617-20.
20. Beutler E. Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods. 3rd ed. New York: Grune Startton; 1984. 133 p.
21. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem. 1972;247:3170-5.
22. Wendel A. Enzymatic basis of detoxication. Vol. 1. New York: Academic Press; 1980. 333 p.
23. Ellman GL, Courtney KD, Andres VJr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol. 1961;7:88-95.
24. de Andrade CR, Tirapelli CR, Haddad R, Eberlin MN, Ramalho LN, Iyomasa MM, Uyemura SA, de Oliveira AM. Hyperhomocysteinemia induced by feeding rats diets rich in DL-homocysteine thiolactone promotes alterations on carotid reactivity independent of arterial structure. Vascul Pharmacol. 2009;51(4):291-8.
25. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. J Clin Invest. 2001;107(10):1263-73.
26. Pushpakumar S, Kundu S, Narayanan N, Sen U. DNA hypermethylation in hyperhomocysteinemia contributes to abnormal extracellular matrix metabolism in the kidney. FASEB J. 2015;29(11):4713-25.
27. Yamada H, Akahoshi N, Kamata S, Hagiya Y, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Takano N, Mori M, Ishizaki Y, Izumi T, Kumagai Y, Kasahara T, Suematsu M, Ishii M. Methionine excess in diet induces acute lethal hepatitis in mice lacking cystathionine γ-lyase, an animal model of cystathioninuria. Free Radic Biol Med. 2012;52(9):1716-26.
28. Mendes RH, Mostarda C, Candido GO, Moraes-Silva IC, D'Almeida V, Belló-Klein A, Irigoyen MC, Rigatto K. Moderate hyperhomocysteinemia provokes dysfunction of cardiovascular autonomic system and liver oxidative stress in rats. Auton Neurosci. 2014;180:43-7.
29. Golbahar J, Aminzadeh MA, Kassab SE, Omrani GR. Hyperhomocysteinemia induces insulin resistance in male Sprague-Dawley rats. Diabetes Res Clin Pract. 2007;76(1):1-5.
30. Lee H, Kim JM, Kim HJ, Lee I, Chang N. Folic acid supplementation can reduce the endothelial damage in rat brain microvasculature due to hyperhomocysteinemia. J Nutr. 2005;135(3):544-8.
31. Kolling J, Scherer EB, da Cunha AA, da Cunha MJ, Wyse AT. Homocysteine induces oxidative-nitrative stress in heart of rats: prevention by folic acid. Cardiovasc Toxicol. 2011;11(1):67-73.
32. Zivkovic V, Jakovljevic V, Djordjevic D, Vuletic M, Barudzic N, Djuric D. The effects of homocysteine-related compounds on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in isolated rat heart. Mol Cell Biochem. 2012;370(1-2):59-67.
33. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Homocysteine and glutathione peroxidase-1. Antioxid Redox Signal. 2007;9(11):1923-40.
34. Jakubowski H. Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. FASEB J. 1999;13(15):2277-83.

Table 1. Values of measured biochemical parameters in the plasma expressed in standard units (x±SEM).

Parameter/ Groups (X±SE)	Control	DL-Hcy	DL-Hcy TLHC
Gluc (mmol/L)	6.07 ± 0.21	5.66 ± 0.97	8.44 ± 0.75 [b*, c*]
Urea (mmol/ L)	10.6 ± 0.89	9.83 ± 0.61	10.03 ± 1.81
Crea (µmol/ L)	48.28 ± 1.34	48.20 ± 3.79	45.00 ± 2.34
Urea (µmol/ L)	86.38 ± 8.01	189.78 ± 50.37	147.26 ± 61.34
TP (g/L)	65.63 ± 1.35	55.00 ± 1.77[a**]	63.80 ± 3.84 [c*]
Alb (g/L)	41.98 ± 0.59	31.00 ± 0.69 [a**]	35.20 ± 1.96[b**,c*]
Chol (mmol/L)	1.39 ± 0.65	1.61 ± 0.10	2.03 ± 0.19 [b**,c*]
HDL (mmol/L)	1.12 ± 0.48	1.19 ± 0.06	1.52 ± 0.12[b**,c*]
LDL (mmol/L)	0.08 ± 0.01	0.19 ± 0.05	0.30 ± 0.05[b**]
TGL (mmol/L)	0.59 ± 0.05	0.52 ± 0.08	0.46 ± 0.09
AST (IU/L)	312.38 ± 22.61	306.00 ± 34.70	232.80 ± 27.03
ALT (IU/L)	122.63 ± 8.67	62.67 ± 7.62[a**]	68.00 ± 10.57[b**]
AMY (IU/L)	1281.50 ± 83.50	2462.17 ± 232.00[a**]	2398.20 ± 304.51[b**]
hsTnT (ng/L)	25.80 ± 6.20	40.88 ± 7.14	19.75 ± 7.36
LDH (IU/L)	3887.13 ± 358.51	5655.00 ± 605.73[a*]	3789.25 ± 625.50 [c*]
Fibr (g/L)	2.60 ± 0.26	1.06 ± 0.04[a**]	1.07 ± 0.07[b**]
VWF Act (%)	214.25 ± 30.45	236.17 ± 36.13	162.00 ± 24.28

Statistical comparisons are marked as follows: a – control vs DL-Hcy $p<0.05$; b – control vs DL-Hcy TLHC; c – DL-Hcy vs DL-Hcy TLHC. P values less than 0.05 were considered to be significant (*$p<0.05$; **$p<0.01$).

Figure Legends

Fig. 1. The effects of DL-Hcy and DL-Hcy TLHC on selected markers of oxidative stress in rat plasma. **A** – MDA concentration; **B** – CAT activity; **C** – GPx activity; **D** – SOD activity. P values less than 0.05 were considered to be significant (*$p<0.05$; **$p<0.01$).

Fig. 2. The effects of DL-Hcy and DL-Hcy TLHC on AChE activity in rat heart. $P<0.05$ was considered to be significant (*$p<0.05$; **$p<0.01$).

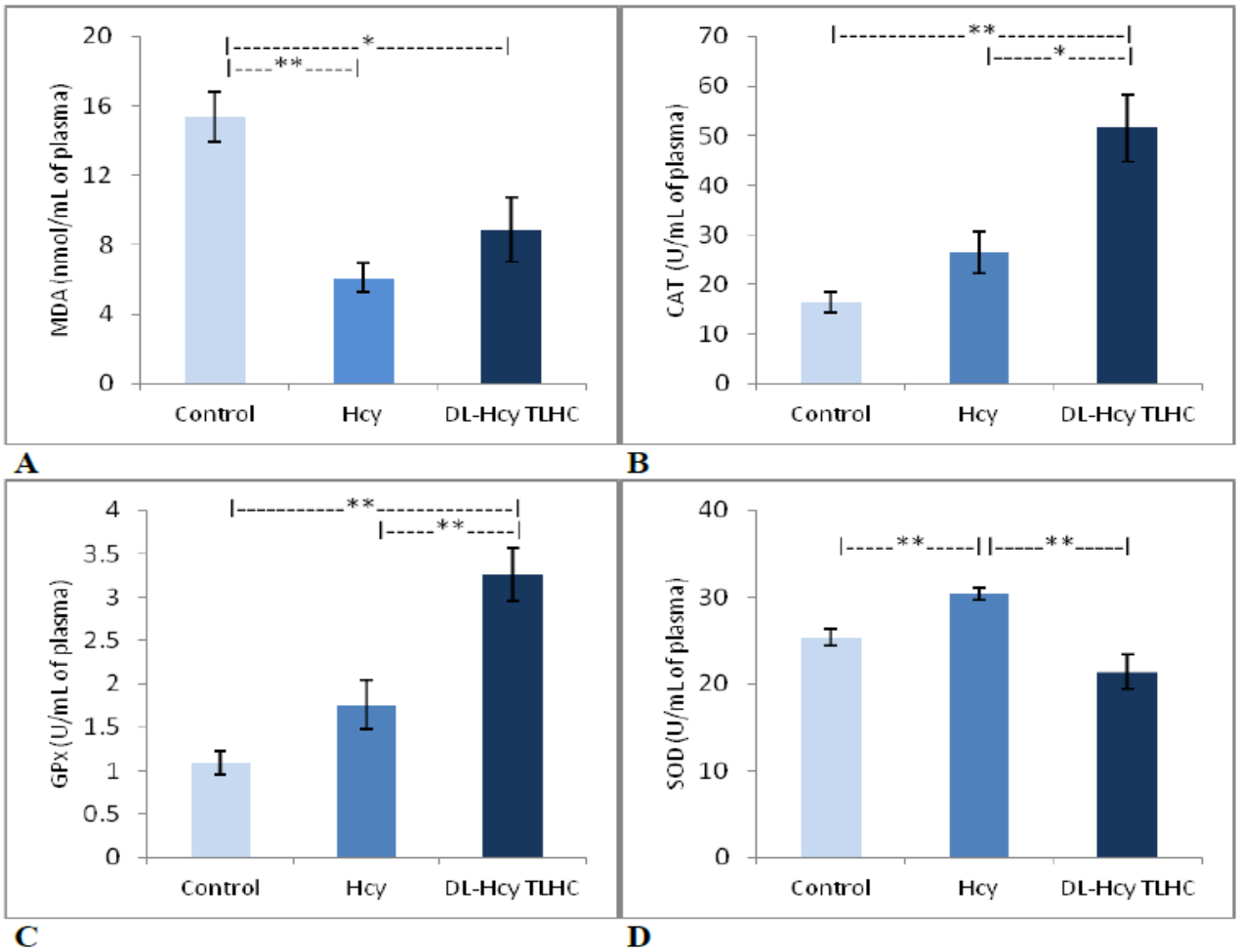

MDA (nmol/mL of plasma)
20
16
12
8
4
0
Control
Hcy
DL-Hcy TLHC
A
CAT (U/mL of plasma)
70
60
50
40
30
20
10
0
Control
Hcy
DL-Hcy TLHC
B
GPx (U/mL of plasma)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Control
Hcy
DL-Hcy TLHC
C
SOD (U/mL of plasma)
40
30
20
10
0
Control
Hcy
DL-Hcy TLHC
D

Fig. 1.

11

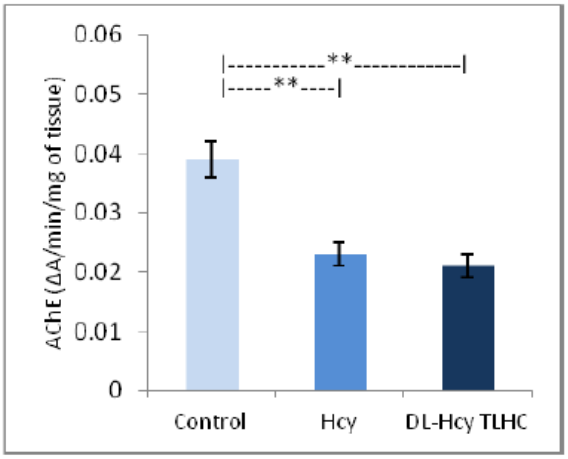

0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
AChE (ΔA/min/mg of tissue)
|----------**----------|
|-----**----|
Control
Hcy
DL-Hcy TLHC

Fig. 2.